

# **Deletion der Untereinheit VIa der Cytochrom c Oxidase in Hefe und heterologe Expression des entsprechenden Rindergens sowie Charakterisierung der Mutanten**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie  
der Philipps–Universität Marburg  
vorgelegt von

**Kara Karen Follmann**

aus Iowa City, USA

Marburg/Lahn 1998

---

# Inhaltsverzeichnis

..

- Einleitung
  - ♦ Die mitochondriale Atmungskette
  - ♦ Die Cytochrom c Oxidase
  - ♦ Isoformen der Cytochrom c Oxidase
  - ♦ Struktur und Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten
  - ♦ Struktur der kernkodierten Untereinheiten
  - ♦ Regulation der Cytochrom c Oxidase
  - ♦ Cytochrom c Oxidase aus *Saccharomyces cerevisiae*
  - ♦ Zielsetzung
- Material
  - ♦ Bakterienstämme und *S. cerevisiae* Stämme
  - ♦ Plasmide
  - ♦ Enzyme, Antikörper und Gewebe
  - ♦ Kits
  - ♦ Radioaktive Nukleotide
  - ♦ Reagenzien für Nährmedien
  - ♦ Reagenzien für die Gelelektrophorese
  - ♦ Farbstoffe
  - ♦ DNA-Längen-Standards
  - ♦ Primer
  - ♦ Sonstige Chemikalien
  - ♦ Säulen- und Filtermaterialien
  - ♦ Geräte
  - ♦ Medien, Lösungen und Puffer
- Methoden
  - ♦ Sicherheitsbestimmungen
  - ♦ Vorbemerkungen
  - ♦ Molekularbiologische Methoden bei *Escherichia coli*
    - ◇ Isolierung von Plasmid-DNA
    - ◇ Analytische Agarosegelelektrophorese
    - ◇ Quantitierung von DNA und RNA
    - ◇ Photometrische Quantitierung
    - ◇ Quantitierung von DNA durch Agarosegelelektrophorese
    - ◇ Aufarbeitung von Oligonukleotiden
    - ◇ Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
    - ◇ Phenol-Chloroform-Extraktion
    - ◇ Ethanol-fällung von DNA
    - ◇ Separation von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese
    - ◇ Elution von DNA aus Agarosegelen
    - ◇ Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase
    - ◇ Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid Kinase
    - ◇ Auffüllen von DNA-Enden mit DNA-Polymerase, Klenow Fragment
    - ◇ Polymerase Chain Reaction (PCR)
    - ◇ Enzymatische Amplifikation eines dsDNA-Fragmentents
    - ◇ Mutagenese PCR
    - ◇ 5'-RACE-PCR
    - ◇ Ligase-Reaktion
    - ◇ Herstellung von kompetenten Zellen
    - ◇ Transformation
    - ◇ Elektrotransformation

- ◊ Vermehrung der Rekombinanten und Isolierung der DNA
- ◊ Anlegen von Übernachtskulturen und Glycerinkulturen
- ◊ Kartierung der Klone durch Restriktionsverdau
- ◊ DNA-Sequenzierung
- ◊ Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung
- ◆ Arbeiten mit RNA
  - ◊ Gesamt-RNA Isolation aus Rindergewebe
  - ◊ RNA Agarosegelelektrophorese
  - ◊ Southern-Transfer von DNA
  - ◊ Radioaktive Markierung der Sonde und Hybridisierung der DNA
  - ◊ Chemilumineszenzmarkierung der Sonden-DNA
  - ◊ Southern-Hybridisierung und Detektion von DNA
  - ◊ Northern-Transfer von RNA
  - ◊ Markierung der Sonde mit Fluorescein-11-dUTP
  - ◊ Northern-Hybridisierung und Detektion von RNA
  - ◊ Reverse Transkription von RNA
- ◆ Molekularbiologische Methoden bei *Saccharomyces cerevisiae*
  - ◊ Isolation von genomischer DNA aus Hefe
  - ◊ Isolation von Gesamt-RNA aus Hefe
  - ◊ Deletion von Genen in Hefe
  - ◊ Sporulation von diploiden Hefezellen
  - ◊ Tetradentrennung der Ascussporen
  - ◊ Transformation von DNA in Hefe
  - ◊ Selektion der Transformanten
- ◆ Proteinchemische Methoden
  - ◊ Anzucht von Hefezellen im Fermenter
  - ◊ Aufnahme von Wachstumskurven
  - ◊ Aufschluß von Hefezellen mit der Glaskugelmühle
  - ◊ Isolation von Mitochondrien aus Hefe
  - ◊ Mitochondrien für die zweidimensionale Gelelektrophorese
  - ◊ Isolation von Mitochondrien für Aktivitätsmessungen
  - ◊ Isolation von Mitochondrien für die Cytochrom c Oxidase Isolation
  - ◊ Ankonzentrieren von Cytochrom c Oxidase aus Mitochondrien
  - ◊ Isolation von Cytochrom c Oxidase aus Hefe
  - ◊ Spektroskopische Bestimmung von Cytochrom c Oxidase
  - ◊ SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
  - ◊ SDS-PAGE nach Kadenbach
  - ◊ SDS-PAGE nach Schagger und Von Jagow
  - ◊ Zweidimensionale Gelelektrophorese
  - ◊ Polarographische Messung der Enzymaktivität
  - ◊ Proteinbestimmung nach Biuret
  - ◊ Herstellung von Hydroxylapatit als Säulenmaterial
  - ◊ Protein-Blotting
  - ◊ Immunofärbung von Proteinblots
- ◆ Ergebnisse
  - ◊ *Saccharomyces cerevisiae* als genetisches System
  - ◊ Erzeugung der Hefe Deletionsmutante *d cox13::HIS3*
    - Amplifikation und Klonierung des *COX13* Gens aus Hefe
    - Austausch des *COX13* ORF gegen ein Markergen
    - Transformation des *d cox13::HIS3* Konstruktes in Hefe
    - Nachweis der Deletion durch Southern Blot Analyse
    - Trennung der *d cox13*- und der Wildtyp-Tetraden
    - Nachweis der homozygoten, haploiden Deletionsstämme
    - Nachweis der Deletion auf transkriptionaler Ebene durch Northern Blot
    - Nachweis der Deletion auf Proteinebene
    - Zweidimensionale Gelelektrophorese

- Wachstumskontrolle auf nichtfermentierbaren Medien
  - ◇ Komplementierung der Deletion durch Rinder Cytochrom c Oxidase BHVIa
    - Isolation des Cytochrom c Oxidase BHVIa Gens
    - Komplementierung des *d cox13::HIS3* Genotyps
    - Untersuchung des Phenotyps der Komplementierung
  - ◇ Komplementierung mit Hilfe des Hefeprecursors
    - Nachweis des BHVIa-Proteins in Hefe
  - ◇ Kinetische Kontrolle der Komplementierung
    - Isolation des Precursors der Rinderleber Untereinheit VIa
  - ◇ Kinetische Untersuchungen an *S. cerevisiae* Cytochrom c Oxidase
    - Aktivitätsmessungen an Cytochrom c Oxidase aus *S. cerevisiae*
    - Regulation von Cytochrom c Oxidase durch Nukleotide
    - Rolle der kernkodierte Cytochrom c Oxidase Untereinheiten
    - Messungen zur Cytochrom c Bindung
  - ◆ Diskussion
    - ◇ Komplementierungsexperimente
      - Heterologe Expression des BHVIa Gens in Hefe
      - Ergebnis der heterologen Komplementierung bei Cytochrom c Oxidase
      - Untersuchungen zum Precursor des Rinderleber Untereinheit VIa Gens
      - Kinetische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase aus *S. cerevisiae*
      - Die Cytochrom c Bindung
      - Rolle der kernkodierte Untereinheiten bei der Cytochrom c Bindung
  - ◆ Zusammenfassung
  - ◆ Literatur
  - ◆ Anhang
    - ◇ Abkürzungen
    - ◇ Sequenzen
    - ◇ Genotypen der verwendeten und erzeugten Hefestämme
    - ◇ Plasmidkarten
- 

..

# Material

...

## Bakterienstämme

*E. coli* XL1 Blue Stratagene, Heidelberg

## *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

YPH499' YPH500 Isogener diploider Stamm

Prof. U. Brandt,  
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt  
CLONTECH Laboratories, USA

SFY526 Isogener diploider Stamm

## Plasmide

pUC18& Boehringer, Mannheim

pYPA-XS Dr. Reinländer, MPI für Biophysik, Frankfurt

pJJ217 Prof. B. Trumpower, Hanover, New Hampshire, USA

pBluescript KS-/SK- Stratagene, Heidelberg

## Enzyme, Antikörper und Gewebe

Die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Amersham bzw. Boehringer Mannheim, ebenso die meisten modifizierenden Enzyme. Sie wurden mit den mitgelieferten Reaktionspuffern eingesetzt.

M-MuLV Reverse Transkriptase AGS,  
Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

Heidelberg

Merck, Darmstadt

Boehringer, Mannheim

RNase Block

Stratagene, Heidelberg

Rinderherz COX

V. Frank, J. Napiwotzki,

Philipps-Universität Marburg

RNaseH aus *E.coli*

Stratagene, Heidelberg

Vent Polymerase (exo<sup>-</sup>)

Biolabs New England, Schwalbach

Anti-Kaninchen IgG, AP-Konjugat

DAKO, Hamburg

Anti-Maus IgG, AP-Konjugat

DAKO, Hamburg

Monoklonaler Ak gegen Rinderherz COX UE VIa + VIc, 378

(Schneyder, 1990)

Monoklonaler Ak gegen Rinderherz COX UE IV, 68H9

(Schneyder, 1990)

Polyklonale Ak gegen Holoenzym Rinderherz COX

AK Prof. Kadenbach,

Philipps-Universität Marburg

Rinderherz

Schlachthof, Marburg

Rinderleber

Schlachthof, Marburg

## Kits

Jet Sorb Gelextraktions Kit

Genomed, Bad Oeynhausen

Sequenase-Kit, Version 2.0

United States Biochemical, USA

Easy Pure DNA Purification Kit

Biozym Diagnostik, Oldendorf

NUCLEOTRAP Extraction Kit

Macherey-Nagel, Düren

ECL Direct Nucleic Acid Labelling

and Detection Systems	Amersham, Braunschweig
GenElute™ Agarose Spin Columns	Supelco, Sigma Deisenhofen
Gene Images random prime labelling module	Amersham, Braunschweig
Gene Images CDP-Star detection module	Amersham, Braunschweig
PCR Purification Kit	QIAGEN, Düsseldorf
rediprime Random Primer Labelling	Amersham, Braunschweig
T7 Sequencing Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
Expand™ High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim

## Radioaktive Nukleotide

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP Amersham, Braunschweig

[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP ICN, Eschwege

## Reagenzien für Nährmedien

Ampicillin	Fluka, Deisenhofen
L-Aminosäuren	Fluka, Deisenhofen
	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	DIFCO, USA
Bacto Trypton	DIFCO, USA
Hefe Extrakt KAT (techn.)	Ohly, Hamburg
IPTG	Stratagene, Heidelberg
DL-Milchsäure, freie Säure 85 %	Amersham, Braunschweig
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base	Gibco BRL, Karlsruhe

## Reagenzien für die Gelelektrophorese

Acrylamid 2X	Serva, Heidelberg
ultraPURE™ Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Riedel de Haen, Hannover
N,N'-Bismethylenacrylamid	Serva, Heidelberg
Methacryloxypropylsilan	Sigma, Deisenhofen
Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Pharmacia, Freiburg

## Farbstoffe

Amidoschwarz 10B	Schleicher & Schüll, Dassel
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bromkresolgrün	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

## DNA–Längen–Standards

DNA Mass Ladder Gibco BRL, Karlsruhe

Bio Ladder AGS, Heidelberg

200 bp DNA ladder Boehringer, Ingelheim

## Primer

von den Firmen MWG–Biotech GmbH und Eurogentec Deutschland GmbH: Hefe\_6aBgl1 5'–GGG CTT GGC CAG TGC GGC CAA GG–3' 5'HefePrec. 5'–AGC TTA TGT TTA GAC AGT GTG CTA AGA GAT ATG CCA GTG–3' 3'HefePrec. 5'–TGG CAT ATC TCT TAG CAC ACT GTC TAA ACA TA–3' BHcoxVIa for 5'–CCC CAA GCT TCT GCC ATA C–3' BHcoxVIa rev 5'–GCT CTA GAG CGC ATC AGC C–3' ycoxVIa for 5'–CGC GGA TCC TGG TCT GTA TTA GAC AAA C–3' ycoxVIa revM'–CCC AAG CTT CGG AGG ACT CGG GAA CC–3' GSP–RT 5'–TTA CTC ATC TTC ATA GCC GG–3' GSP 1 M'–CGG GTT CAC ATG AGG G–3' GSP 2M'–GAG GGT TAT GGA ATA GGG–3' Q<sub>T</sub> 5'–CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TTT T–3' Q<sub>0</sub> 5'–CCA GTG AGC AGA GTG ACG–3' Q<sub>I</sub> 5'–GAG GAC TCG AGC TCA AGC–3'

## Sonstige Chemikalien

ADP, K–Salz (98–100% Reinheit)	Boehringer, Mannheim
ATP, Na <sub>2</sub> –Salz (Grade I: 99% Reinheit)	Sigma, Deisenhofen
Natriumcholat	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Cytochrom c aus <i>S. cerevisiae</i> , mind. 85%	Sigma, Deisenhofen
Cytochrom c aus Pferdeherz, mind. 60%	Sigma, Deisenhofen
Dodecyl–b–D–Maltosid, > 99%	Fluka, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
Phosphoenolpyruvat, Mono K–Salz, 98%	Fluka, Deisenhofen
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Rotiphenol, equilibriert	Roth, Karlsruhe
Triton X–100	Serva, Heidelberg
Tween–80	Serva, Heidelberg

## Säulen– und Filtermaterialien

Hydroxylapatit	diese Arbeit
Sephacrose CL–6B	Pharmacia, Freiburg
Mikrokonzentratoren	Amicon, Witten
Ultrafiltrationsmembran DIAFLO YM100	Amicon, Witten

## Geräte

DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Überlingen
Glaskugelmühle	Biospec Products, USA
Glasperlen $\varnothing$ 0.25–0.56 mm	Roth, Karlsruhe
Hybond™ –N+ Vers. 2.0 Membran	Amersham, Braunschweig
Pegasus Semi Dry Blot	PHASE GmbH, Mölln
Protran Nitrocellulose Membran 0.45 $\mu$ m	Schleicher & Schüll, Dassel
Röntgenfilm X–Omat XAR–5	Kodak, USA
Röntgenfilm BioMax	Röntgen Bender, Berlin

**Spektralphotometer, 16 UV–VIS**

**Perkin–Elmer, USA**

**Ultrafiltrationskammer**

**Amicon, Witten**

**Zweistrahlphotometer Uvikon 810**

**Kontron, Offenbach**

**Zweiwellenlängen/Doppelstrahlphotometer UV 300**

**Shimadzu, Düsseldorf**

## **Medien, Lösungen und Puffer**

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert. Lösungen hitzeunbeständiger Substanzen wurden sterilfiltriert.

## **Medien**

### **LB–Medium**

1 % Bacto Trypton 0.5 % Hefe Extrakt 1 % NaCl für Agarplatten 15 g/L Agar YPD–Medium 1 % Hefe Extrakt 2 % Bacto Pepton 2 % Glukose Autoklavieren bei 105°C

### **YPEG–Medium**

1 % Hefe Extrakt 2 % Bacto Pepton 3 % Glycerin 4 % Ethanol, nach dem Autoklavieren zugeben

### **YLac–Medium**

2 % Hefe Extrakt 3 % DL–Milchsäure, pH 6 einstellen

### **Sporulationsmedium, Hefe**

1 % K–Acetat 0.1 % Hefe Extrakt 0.05 % Dextrose 1.3 g/L "drop out powder"

### **Selektionsmedium, Hefe**

1.3 g/L "drop out powder" (–His bzw. –His und –Leu) 1.7 g/L YNB, pH 5.8 einstellen 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 mL/L sterile 40%ige Glukoselösung nach dem Autoklavieren zugeben

### **"drop out powder"**

0.25 g Adeninsulfat 0.12 g L–Arginin×HCl 0.6 g L–Asparaginsäure 0.66 g L–Glutaminsäure (Na–Salz, · H<sub>2</sub>O) 0.12 g L–Histidin 0.36 g L–Leucin 0.18 g L–Lysin × HCl 0.12 g L–Methionin 0.3 g L–Phenylalanin 2.25 g L–Serin 0.24 g L–Tryptophan 0.18 g L–Tyrosin 0.9 g Valin 0.12 g Uracil Die Aminosäure, nach der selektiert werden soll, wird weggelassen. Pro Liter Medium werden 1.3 g des „drop out powders“ zugegeben.

## **Lösungen**

Adenosintriphosphat 10 mM in H<sub>2</sub>O Ampicillin M mg/mL in H<sub>2</sub>O, pH 7.0 Ascorbat 1 M in 2 M Tris lösen, pH 7.4 einstellen

### **Bindesilan–Lsg.**

300 µL 10% Essigsäure 30 µL Methacryloxypropyltrimethoxysilan mit Ethanol auf 10 mL auffüllen

### **Biuret Reagenz**

3 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (für Proteinbestimmung) 9 g/L K–Na–Tartrat 8 g/L NaOH 5 g/L KI Cytochrom c 4 mM in H<sub>2</sub>O dNTP, jeweils: 20 mM in H<sub>2</sub>O



## Denaturierungslösung

4 M Guanidiniumthiocyanat (für RNA-Isolation) 25 mM Na-Citrat, pH 7.0 0.5 % Sarcosyl 0.1 M Mercaptoethanol ansetzen mit DEPC-H<sub>2</sub>O DEPC-H<sub>2</sub>O 0.1 % Inkubation über Nacht, autoklavieren

## 4 X Entwickler für Röntgenfilme

4 g/L Metol 52 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O frei) 12 g/L Hydrochinon 104 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O frei) 4 g/L KBr Ethidiumbromid 10 mg/mL

## Fixierer für Röntgenfilme

200 g/L Natriumthiosulfat 20 g/L Kaliummetabisulfit

## Heringsperma-DNA 10 mg/mL in TE pH 8.0

scheren und beschallen.

## Lösungen zur Hydroxylapatitherstellung:

1. 1 M NaCl 2. 0.5 M CaCl<sub>2</sub> 3. 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4. 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5. 50 mM Na-Phosphat

## NBT-Lsg.

100 mg in 1.5 mL 70% DMF Na-Acetat 3 M pH 5.3

## PLATE

90 mL sterile 45%ige PEG 4000-Lsg. 10 mL 1 M Li-Acetat 1 mL 1 M Tris-HCl, pH 7.5 200 µL 0.5 M EDTA PMSF 100 mM in Isopropanol RNase A 10 mg/mL in TE-Puffer, pH 8.0 5 min, 100 °C, bei 4° C lagern

## SDS-Lsg.

10 % in H<sub>2</sub>O

## TENS (Plasmidisolation)

10 mM Tris, freie Base 1 mM EDTA 0.1 N NaOH 0.5 % SDS

## TFB 1 (komp. *E.coli*)

100 mM RbCl 50 mM MnCl<sub>2</sub> 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl<sub>2</sub> 15 % Glycerin, pH 5.8, steril filtriert

## TFB 2

10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl<sub>2</sub> 15 % Glycerin, pH 8.0, autoklaviert

## X-Gal

4 % DMF Zymolyase 2.5 mg in 1 mL 1M Sorbitol

## Puffer für die Agarosegelelektrophorese

6 X Auftragspuffer 2.5 mg Bromphenolblau 2.5 mg Xylencyanol FF 300 µL Glycerin 700 µL H<sub>2</sub>O

### **10 X TBE–Puffer**

890 mM Tris–HCl, pH 8.3 (für Agarosegele) 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

### **Lösungen für denaturierende PAGE nach Kadenbach**

Acrylamidlösung 50 % Acrylamid 1.56 % N,N'–Methylenbisacrylamid

### **Trenngelpuffer**

0.75 M Tris–HCl, pH 8.45 7.2 M Harnstoff 0.2 % SDS

### **Sammelgelpuffer**

125 mM Tris–HCl, pH 6.8 0.125 % SDS

### **Elektrodenpuffer**

25 mM Tris–HCl, pH 8.4 192 mM Glycin 0.1 % SDS

### **Färber**

0.25 % Coomassie R250 10 % Eisessig 30 % Isopropanol

### **Entfärber**

7.5 % Eisessig 5 % Ethanol

### **Lösungen für denaturierende PAGE nach Schägger**

Acrylamidlösung 48 % Acrylamid 1.5 % N,N'–Methylenbisacrylamid

### **Anodenpuffer**

0.2 M Tris–HCl, pH 8.9 Gelpuffer 3 M Tris–HCl, pH 8.45 0.3 % SDS

### **Kathodenpuffer**

0.1 M Tris, freie Base 0.1 M Tricin 0.1 % SDS

### **Puffer für Blue Native PAGE nach Schägger**

#### **Auftragspuffer**

1 M Aminocaprinsäure 50 mM Bis–Tris–HCl, pH 7.0 2 µL 10% Dodecylmaltosid / 200 µg Protein

#### **Kathodenpuffer A**

50 mM Tricin 15 mM Bis–Tris–HCl, pH 7.0 (4°C) 0.02 % Serva Blau G

#### **Kathodenpuffer B**

s.o. aber 0.002 % Serva Blau G

## Silberlösung

2.1 mL 25% NH<sub>3</sub> ("Silver Stain") 32 mL 0.36% NaOH 6 mL 19.4% AgNO<sub>3</sub> 109.9 mL H<sub>2</sub>O

## Entwickler

1.5 mL 0.5% Zitronensäure ("Silver Stain") 31 mL Methanol 150 µL 37% Formaldehyd 117.5 mL H<sub>2</sub>O

## Allgemeine Puffer

### AE-Puffer

50 mM Na-Acetat, pH 5.3 (für RNA-Isolation aus Hefe) 10 mM EDTA

### COX Absolutspektrenpuffer

200 mM K-Phosphat, pH 7.2 2 % Na-Cholat 0.5 % Na-Desoxycholat

### COX Differenzspektrenpuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.4 200 mM KCl 5 % Triton X-100

### COX-Isolationspuffer

_____		I	II	IV	VII	VIII	IX
Puffer							
NaCl	mM	200	600	250	200		100
TX-100	%	–	–	0.05	0.1	0.1	0.05
KP <sub>i</sub>	mM	10	10	–	–	–	–
NaP <sub>i</sub>	mM	–	–	100	70	150	–
EDTA	mM	5	5	–	–	–	–
MOPS	mM	–	–	–	–	–	20
pH-Wert		7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2

### Differenzspektren Mitochondrien

4 % Triton X-100 120 mM NaCl 20 mM MOPS, pH 7.2 300 mM Saccharose

### Hefemitochondrien Isolationspuffer

(für 2D-Gelelektrophorese) 400 mM Saccharose 20 mM MOPS, pH 7.2 1 mM EDTA

### Hefemitochondrien Isolationspuffer

(für COX Isolation) 300 mM Sorbit 50 mM K-Phosphat, pH 7.2 5 mM EDTA 1 mM PMSF (frisch zugeben)

### Hefe-DNA Isolationspuffer

1 % SDS 2 % Triton X-100 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA

## **10 X MOPS**

200 mM MOPS 80 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 7.0 mit 2 N NaOH, ansetzen DEPC-H<sub>2</sub>O

## **Puffer A**

100 mM Tris-HCl, pH 9.5 (Northern Blot) 300 mM NaCl autoklavieren, frisch verwenden

## **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 1 mM EDTA

## **Southern Blot Puffer**

### **Denaturierungslösung**

1.5 M NaCl 0.5 M NaOH, pH 12

### **Neutralisierungslösung**

1.5 M NaCl 0.5 M Tris-HCl, pH 4-5 20 X SSC 3 M NaCl 0.3 M Na-Citrat

### **Waschlösung I**

2 X SSC 0.5 % SDS

### **Waschlösung II**

2 X SSC 0.1 % SDS

### **Waschlösung I**

6 M Harnstoff (nichtradioaktiv) 0.4 % SDS 0.5' SSC

## **Western Blot Puffer**

### **Anode-I-Puffer**

30 mM Tris, freie Base 20 % Methanol

### **Anode-II-Puffer**

300 mM Tris, freie Base 20 % Methanol

### **Amidoschwarzlösung**

0.025 % Amidoschwarz 22 % Ethanol 7.5 % Essigsäure

### **Kathodenpuffer**

25 mM Tris, freie Base 40 mM 6-Aminohexansäure 20 % Methanol

### **Sartoblot-Transferpuffer**

48 mM Tris-HCl, pH 9.2 39 mM Glycin 1.3 mM SDS 20 % Methanol

**Substratpuffer**

100 mM Tris-HCl, pH 9.5 100 mM NaCl 50 mM MgCl<sub>2</sub>

**Puffer für Aktivitätsmessungen an der Sauerstoffelektrode****Capaldi-Puffer**

5 mM MES, pH 6.2 0.05 % Dodecylmaltosid

**Dodecylmaltosidpuffer**

50 mM K-Phosphat, pH 7.4 5 mM MgSO<sub>4</sub> 0.05 % Dodecylmaltosid

**Messpuffer**

50 mM K-Phosphat, pH 7.4 5 mM MgSO<sub>4</sub> 1 % Tween-80

---

...

# Methoden

...

## Sicherheitsbestimmungen

Die während dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit *Escherichia coli* und dem Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* wurden gemäß den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren", erlassen vom Bundesministerium für Forschung und Technologie, durchgeführt. Teile der durchgeführten Arbeiten unterliegen der Sicherheitsstufe S1. Abfälle, die Mikroorganismen oder deren Nukleinsäuren enthalten, sind zu sterilisieren bzw. denaturieren. Arbeiten mit den radioaktiven Isotopen  $^{32}\text{P}$  und  $^{35}\text{S}$  wurden ausschließlich in dafür ausgewiesenen Räumen und hinter einer Plexiglasscheibe durchgeführt. Radioaktive Abfälle wurden gesammelt und gemäß der Strahlenschutzverordnung entsorgt. Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden und mutagenen Substanzen, z. B. Acrylamid, N,N'-Bismethylenacrylamid, Phenol, Chloroform, Ethidiumbromid, etc. wurden unter dem Abzug durchgeführt. Abfälle dieser Substanzen wurden getrennt gesammelt und entsorgt. Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

## Vorbemerkungen

Experimente, die die Verwendung von Bakterien oder Hefen beinhalteten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Gefäße und Lösungen wurden vor Gebrauch 30 min bei 120 ° C und 2,5 bar autoklaviert. Lösungen, die hitzeempfindliche Substanzen enthalten, wurden sterilfiltriert. Mit Bakterien oder Hefen kontaminierte Lösungen und Gefäße wurden nach dem Arbeiten erneut autoklaviert. Alle biochemischen und molekularbiologischen Experimente wurden, soweit nicht anders beschrieben, im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt.

## Molekularbiologische Methoden bei *Escherichia coli*

### Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mit Hilfe eines Tris-EDTA-NaOH-SDS Puffers (TENS). 1.5 bis 3 mL einer Übernachtskultur eines *E.coli* Stammes wurden 2 min bei 15000 × g pelletiert, das Medium abgegossen und die Zellen in dem zurückbleibendem Medium resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 300 µL TENS zugegeben und anschließend 5 s gevortext. Nach der Zugabe von 150 µL einer 3 M Na-Acetat Lösung, pH 5.2 vortexte man erneut und zentrifugierte 2 min bei 15000 × g. Der Überstand wurde in ein neues Cup überführt und die Plasmid-DNA daraus durch Zugabe von 900 µL absolutem, -20°C kaltem Ethanol gefällt. Die Pelletierung der Plasmid-DNA erfolgte für 15 min bei 15000 × g. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit -20°C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Lösen der Plasmid-DNA erfolgte in 20 bis 50 µL TE-Puffer, pH 8.0. Die noch enthaltene RNA wurde durch 30 minütige Inkubation bei 37°C mit 10 µg RNase abgedaut. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte sowohl zur Klonierung als auch zur Sequenzierung eingesetzt werden und war bei 4°C mehrere Monate haltbar.

### Analytische Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden in verschiedenen Apparaturen mit Volumina zwischen 50 mL und 150 mL durchgeführt. Die Konzentration der Gele lag zwischen 0.7% und 1.5% Agarose, abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Zum Gießen der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 55° C wurde die Lösung in die Elektrophoreseapparatur gegossen und ein Kamm zur Formung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entnommen und die Kammer mit TBE-Puffer gefüllt, so daß das Gel gerade mit Puffer bedeckt war. Die mit Auftragspuffer versetzte DNA-Lösung konnte nun in die Taschen des Gels pipettiert werden. Als Längenstandard wurden käufliche DNA-Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde

bei einer Spannung von 100 bis 150 V durchgeführt. Zur Anfärbung der DNA gab man 5 µL Ethidiumbromidlösung je 100 mL Agaroselösung vor dem Gießen des Geles zu der 55° C warmen Agaroselösung. Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht bei 354 nm.

## **Quantitierung von DNA und RNA**

### **Photometrische Quantitierung**

Photometrische Quantitierung, sowohl von dsDNA als auch von ssDNA und RNA, erfolgte durch Messung der Extinktion bei Wellenlängen von  $\lambda = 330$  nm bis 255 nm. Im Vergleichsstrahlengang befand sich eine Küvette mit dem gleichen Puffer in dem auch die Probe gelöst war. Die Berechnung der DNA-Menge und deren Reinheitsgrad erfolgten unter Verwendung der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm. Eine Extinktion von 1 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht für dsDNA einer Konzentration von 50 µg/mL, für ssDNA einer Konzentration von 33 µg/mL und für RNA einer Konzentration von 40 µg/mL.

### **Quantitierung von DNA durch Agarosegelelektrophorese**

Die DNA, deren Menge bestimmt werden soll, wurde zusammen mit einer Konzentrationsreihe einer quantitierten Marker-DNA in gleichen Mengen auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach beendeter Elektrophorese und Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Durch optischen Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu quantifizierenden DNA-Probe und der der Marker-DNA konnte die DNA-Menge mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden.

### **Aufarbeitung von Oligonukleotiden**

Lagen die Primer in ammoniakalischer Lösung vor, wurde das Lösungsmittel an der Speed-Vac abgedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Zur Reinigung folgte eine Ethanolfällung. Anschließend wurden die Primer in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen und die Konzentration der Primerlösungen photometrisch bestimmt. Primer der Firmen Eurogentec und MWG-Biotech mußten nur noch in der entsprechenden Menge Wasser aufgenommen werden.

### **Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Vorbereitung von Insert und Vektor zur Klonierung wurden beide mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Reaktionen wurden unter den von den Herstellern der Enzyme angegebenen Bedingungen und in den mit den Enzymen gelieferten Puffern durchgeführt. Bei Doppelverdauen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer erfordern, wurde zunächst der Verdau mit der geringeren Salzkonzentration durchgeführt und die Salzkonzentration anschließend dem zweiten Enzym entsprechend erhöht. Normalerweise inkubierten die Ansätze für 1 h bei 37° C, bei Doppelverdauen mit Enzymen die unterschiedliche Puffer erfordern, inkubierten die Ansätze 1 h pro Enzym. Die Reaktionsansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt: × µL

DNA Lösung (je nach Konzentration) 1 – 10 U Enzym (max. 10% des Gesamtvolumens) 10% des Gesamtvolumens 10-fach Puffer ad 20 µL H<sub>2</sub>O Im Anschluß wurde das Ergebnis des Verdau auf einem 0.8 – 1.5%igem Agarosegel überprüft. Zur Trennung von Enzymen und Salzen von der DNA erfolgte eine Ethanolfällung. Sollten DNA Fragmente einer bestimmten Größe isoliert werden, wurden die Fragmente durch präparative Agarosegelelektrophorese getrennt und aus dem Gel extrahiert.

### **Phenol-Chloroform-Extraktion**

Die Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen diente der Entfernung von im nächsten Schritt möglicherweise störenden Enzymen. Zum Beispiel wurden Restriktionsenzyme vor einer anschließenden Dephosphorylierung der Vektor-DNA aus der Reaktionsmischung des Verdau extrahiert. Die Reaktionsmischung wurde dazu mit TE-Puffer auf 200 µL verdünnt und danach mit der gleichen Menge Phenol / Chloroform (1:1) versetzt und für 1 min gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 30 s bei 15000 × g. Die wäßrige Phase wurde danach in ein neues Eppendorf Cup überführt und die DNA daraus, wie weiter unten beschrieben, gewonnen.

## **Ethanol-fällung von DNA**

DNA-Lösungen wurden zur Fällung mit 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 4–5 und 2–3 Vol. absolutem Ethanol versetzt und vorsichtig durchmischt. Inkubation über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erhöhte die Ausbeute. Durch 60 minütige Zentrifugation bei  $15000 \times g$  ließ sich die DNA als Pellet gewinnen. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA, je nach weiterer Verwendung, in TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **Separation von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese**

Da beim Restriktionsverdau von DNA meist mehrere DNA-Fragmente entstanden, aber nur ein bestimmtes von diesen Fragmenten zur Klonierung eingesetzt werden sollte, mußte dieses Fragment von den anderen abgetrennt werden. Dazu bediente man sich der präparativen Gelelektrophorese. Es wurden spezielle Kämme benutzt, die es ermöglichen größere DNA-Lösungsvolumina aufzutragen. Die gewünschte Bande konnte danach auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten werden. Dabei mußte so schnell wie möglich gearbeitet werden, da DNA durch Einstrahlung von UV-Licht zerstört wird.

## **Elution von DNA aus Agarosegelen**

DNA wurde mit Kits unterschiedlicher Hersteller analog der Vorschriften aus Agarosegelen eluiert.

## **Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase**

Um die Religation des Vektors bei der Klonierung zu reduzieren, wurden die durch Restriktionsverdau geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert. Dazu gab man alkalische Phosphatase entweder direkt nach dem Verdau zu oder schloß dem Verdau zuerst eine Ethanol-fällung an. Die zweite Methode zeigte im Kontroll-experiment die bessere Reduktion der Religation. Zumeist wurden Dephosphorylierungen in einem Gesamtvolumen von  $20\ \mu\text{L}$  durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Mengen DNA eingesetzt,  $1/10$  des Gesamtvolumens an Reaktionspuffer und ebenfalls  $1/10$  des Gesamtvolumens an alkalischer Phosphatase zugegeben. Der Ansatz inkubierte 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ , wonach nochmal  $1\ \mu\text{L}$  alkalische Phosphatase zugegeben wurde. Es folgte eine weitere Inkubation von 1–2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Nach beendeter Reaktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

## **Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid Kinase**

Da bei der enzymatischen Amplifizierung von Inserts keine phosphorylierten Primer verwendet wurden, mußten die Fragmente nach der PCR phosphoryliert werden, bevor sie zur Klonierung eingesetzt werden konnten. Die Reaktion kann mit maximal  $50\ \text{pmol}$  DNA durchgeführt werden. Reaktionsansatz:  $x\ \mu\text{L}$  DNA-Lösung  $2\ \mu\text{L}$  10-fach Polynukleotid Kinase Puffer  $1.3\ \mu\text{L}$  10 mM ATP  $3\ \mu\text{L}$  Enzym (1:10 verdünnt) ad  $20\ \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  Reaktionsbedingungen: 1 h,  $37^{\circ}\text{C}$  Abbruch: 5 min,  $65^{\circ}\text{C}$

## **Auffüllen von DNA-Enden mit DNA-Polymerase, Klenow Fragment**

Wenn die Klonierung von mit Restriktionsendonukleasen behandelten Inserts in einen Vektor mit glatten Enden ("blunt end") erfolgen soll, müssen die über-stehenden 5'-Enden ("sticky ends") mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Außerdem entstehen bei der Verwendung bestimmter Polymerasen für die PCR überhängende DNA-Enden, die vor einer Klonierung geglättet werden müssen. Reaktionsansatz:  $10\ \mu\text{L}$  DNA-Lösung  $2\ \mu\text{L}$  10-fach Klenow Puffer  $3\ \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$   $1\ \mu\text{L}$  20 mM dNTP-Lösung  $1\ \mu\text{L}$  Klenow Enzym Reaktionsbedingungen: 15 min, Raumtemperatur Abbruch: 10 min,  $75^{\circ}\text{C}$  Das Enzym mußte vor der Ligation nicht entfernt werden.

## **Polymerase Chain Reaction ( PCR )**



## Enzymatische Amplifikation eines dsDNA-Fragmentes

Zur Klonierung verwendete DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Reaktionsansatz: 1.0 µL DNA-Lösung (10 ng/µL) 5.0 µL 10-fach Puffer 5.0 µL 20 mM dNTP-Lösung 1.5 µL Primer 1 (10 pmol/µL) 1.5 µL Primer 2 (10 pmol/µL) 0.5 µL *Taq/Pwo* Polymerase x µL H<sub>2</sub>O ad 50 µL Die Reaktionen verliefen in einem DNA Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer unter Verwendung spezieller dünnwandiger PCR-Cups. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Sequenz und Länge der Primer und wurde wie folgt berechnet.  $T_H$  theoretisch =  $4 \cdot [G + C] + 2 \cdot [A + T] - 5$   $T_M$  theoretisch =  $4 \cdot [G + C] + 2 \cdot [A + T]$   $T_H$ : theoretische Hybridisierungstemperatur  $T_M$ : theoretische Schmelztemperatur PCR-Reaktionen wurden unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Die konkreten Bedingungen werden im Weiteren bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

## Mutagenese PCR

Diese PCR Methode wurde zum Austausch von Nukleotiden, zum Beispiel zur Erzeugung von Schnittstellen im "Template" eingesetzt. Zur Einführung der Mutation wurden zunächst einige PCR-Zyklen mit Klenow Polymerase in folgendem Ansatz durchgeführt. 1.0 µL DNA-Lösung (10 ng/µL) 5.0 µL Klenow "fill in" Puffer 5.0 µL 20 mM dNTP-Lösung 1.5 µL Primer 1 (10 pmol/µL) 1.5 µL Primer 2 (10 pmol/µL) 5.0 µL Klenow Polymerase x µL H<sub>2</sub>O ad 50 µL Es wurden 5 Zyklen durchgeführt, wobei 1 µL des Enzyms nach jedem Zyklus erneut zugegeben werden mußte. Die Elongation erfolgte 7 min bei 30°C, das "Annealing" 1 min bei 60°C. Zur Amplifikation des mutierten Fragmentes wurden 1 bis 2 µL dieses Ansatzes erneut für 35 Zyklen PCR mit *Taq / Pwo* Polymerase eingesetzt.

## 5'-RACE-PCR

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, unbekannte 5'-Bereiche von Genen aus cDNA zu amplifizieren. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Leber isoliert und durch eine Reverse Transkriptase Reaktion mit dem genspezifischen Primer GSP-RT cDNA erzeugt. Da RNA oft Sekundärstrukturen bildet, wurden zusätzliche Denaturierungsschritte eingefügt. Folgende Reaktion wurde durchgeführt: 2.0 µL RT-Puffer 4.0 µL 20 mM dNTP-Lösung 1.0 µL 0.1 M DTT 2.0 µL GSP-RT Primer (20 pmol) 0.4 µL Gesamt-RNA (5 µg) 0.5 µL RNase-Block 9.1 µL DEPC-H<sub>2</sub>O 5 min, 90°C 90 s auf Eis 1.0 µL Reverse Transkriptase 10 min, 50°C langsam abkühlen auf 42°C 6 min, 80°C 2 min auf Eis 1.0 µL Reverse Transkriptase 60 min, 42°C 7 min, 50°C 15 min, 70°C Abbau der RNA-Stränge: 0.5 µL RNaseH (2.5 U) 20 min, 37°C 380 µL TE, pH 7.5 Diese Fraktion entspricht dem 5'-Ende "nontailed" cDNA Pool. Die enthaltene cDNA wurde mit Mikrokon-100 Konzentratoren ankonzentriert. "Poly(A)-Tailing": 4.0 µL 5-fach TdT Puffer 4.0 µL 1 mM dATP 1.0 µL TdT (1 U), terminale Transferase 3.0 µL cDNA 8.0 µL H<sub>2</sub>O 5 min, 37°C 5 min, 65°C auf 500 µL mit TE, pH 7.5 auffüllen

### Touch Down PCR:

1.0 µL cDNA 1.0 µL Q<sub>T</sub> Primer (2 pmol) 5.0 µL 20 mM dNTP-Lösung 5.0 µL 10-fach Puffer 32.5 µL H<sub>2</sub>O 5 min, 98°C 2 min, 48°C 2.5 µL Q<sub>0</sub> Primer (25 pmol) 2.5 µL GSP 1 Primer (25 pmol) 0.5 µL *Taq/Pwo* Polymerase 40 min, 72°C Für die Touch Down PCR kamen verschiedene Variationen zum Einsatz. Zum Beispiel: 60°, 58°, 56°, 54°, 52°, 50°C je 2 Zyklen 50°C, 20 Zyklen 1 min, 94°C Denaturierung 1 min, 72°C Elongation 30 s, "Annealing" Anschließend wurde eine zweite ("nested") PCR mit inneren, genspezifischen Primern durchgeführt.: 1.0 µL DNA (1. PCR 1:20 verdünnt) 1.0 µL Q<sub>1</sub> Primer (10 pmol) 1.0 µL GSP<sub>2</sub> Primer (10 pmol) 5.0 µL dNTP-Lösung 5.0 µL 10-fach Puffer 0.5 µL *Taq/Pwo* Polymerase 36.5 µL H<sub>2</sub>O Es wurde erneut eine Touch Down PCR durchgeführt.

## Ligase-Reaktion

Um ein DNA-Fragment in einen linearen und dephosphorylierten Vektor zu klonieren, wurde folgende Reaktion durchgeführt. **Reaktionsansatz:** 1 µL Vektor-DNA 2 µL DNA-Lösung 1 µL 10-fach Ligase Puffer 1 µL T4 Ligase (1U) 1 µL 50% PEG 4 µL H<sub>2</sub>O Reaktionsbedingungen: 4 h, Raumtemperatur Bei einer Ligation sollte das Verhältnis zwischen Vektor und DNA-Fragment 1 : 2 sein. Dieser Reaktionsansatz gilt sowohl für "blunt end" als auch für "sticky end" Ligationen. Um die Ligation überprüfen zu können, wurden

folgende Kontroll-experimente unter analogen Bedingungen durchgeführt. **Negativkontrolle:** Reaktionsansatz, wie oben, ohne DNA-Fragment **Ligationskontrolle:** Reaktionsansatz, wie oben, ohne DNA-Fragment und mit Vektor DNA, die nicht dephosphoryliert wurde.

## Herstellung von kompetenten Zellen

200 mL LB-Medium wurden mit 2 mL einer Übernachtskultur des *E.coli* Stammes XL1 Blue angeimpft, und die Zellen bei 37°C bis zu einer optischen Dichte, gemessen bei 600 nm, von  $OD_{600} = 0.5$  wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und 2000× g pelletiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 30 mL je 100 mL Ausgangskultur kaltem TFB 1 Puffer, worin die Zellen dann 90 min bei 4°C inkubierten. Es wurde erneut 5 min bei 2000×g und 4°C zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in kaltem Puffer TFB 2 resuspendiert (4mL / 100 mL Ausgangskultur). 400 µL Aliquots dieser kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten dann mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

## Transformation

Zu 10 – 20 µL Ligationsansatz wurden 100 µL kompetente Zellen gegeben. Gleichzeitig wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. **Positivkontrolle:** 1 µg "supercoiled" Plasmid DNA + 100 µL kompetente Zellen **Negativkontrolle:** keine DNA, 100 µL kompetente Zellen Die Suspension inkubierte 30 min auf Eis und wurde danach 2 min einem Hitzeschock von 42° C ausgesetzt. Nach der Zugabe von 500 µL LB-Medium inkubierten die Zellen 1 h bei 37° C. Verschiedene Mengen dieser Ansätze wurde mit Hilfe eines Triglasky-Spatels auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Selektion zwischen Klonen, die ein Insert tragen und solchen, die kein Insert tragen, erfolgte durch unterschiedliche Antibiotikaresistenzen und durch blau-weiß Screenen, wenn das für die Klonierung verwendete Plasmid ein *b* –Galaktosidase-kodierendes *lacZ* Gen enthielt, welches durch die Klonierung eines Inserts unterbrochen wurde. Die Transformationsansätze wurden jeweils auf Agarplatten ausgestrichen, die entsprechende Antibiotika bzw. IPTG und X-Gal enthielten.

## Elektrotransformation

Bei der Transformation mit Elektroporation handelt es sich um eine schnellere und effizientere Methode zur DNA-Transformation. Hierzu wurden 40 µL kompetente Zellen mit 1.5 µL eines Ligationsansatzes in einer Küvette auf Eis gekühlt. Die Transformation der DNA in die Zellen erfolgte durch einen elektrischen Puls von 2.5 kV. Danach wurde sofort 1 mL LB-Medium zu dem Ansatz gegeben, und dieser 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektionsplatten ausgestrichen.

## Vermehrung der Rekombinanten und Isolierung der DNA

Einzelne Zellkolonien, die auf den Platten der Transformationsansätze gewachsen waren, wurden zum Animpfen von 3 mL Übernachtskulturen verwendet. Nach 16 h Inkubation wurde mit diesen Zellen eine Plasmidisolierung vorgenommen. Gleichzeitig wurde ein Teil der Übernachtskultur dazu verwendet Glycerinkulturen anzusetzen und Agarplatten auszustreichen.

## Anlegen von Übernachtskulturen und Glycerinkulturen

Mit einer sterilen Platinöse impfte man 3–50 mL Medium mit Bakterien von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur an. Die Bakteriensuspension inkubierte über Nacht bei 37° C und 250 rpm. Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurde ein Aliquot der Übernachtskultur in einem Eppendorf Cup mit dem gleichen Volumen Glycerin gemischt und anschließend bei -80° C eingefroren.

## Kartierung der Klone durch Restriktionsverdaue

Um zu überprüfen, ob ein Klon die richtigen Gene trägt, wurden mit den isolierten Plasmiden mehrere Verdaue mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde anschließend durch Agarosegel-elektrophorese charakterisiert und mit den, anhand von Genkarten

berechneten, theoretischen Werten verglichen. Stimmt diese Werte annähernd überein, handelte es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um den gewünschten Klon. Außerdem konnte durch geschickte Wahl der Restriktionsenzyme die Orientierung der Gene im Plasmid bestimmt werden.

## **DNA-Sequenzierung**

In dieser Arbeit wurde zur DNA-Sequenzierung die Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) benutzt. Die Sequenzierung der Klone erfolgte unter Verwendung des T7Sequencing™ Kits von Pharmacia. 1. Denaturierung der dsDNA 40 µL mit TENS präparierte Plasmid-DNA 10 µL 2 N NaOH 20 min, 37°C 2. Fällung der ssDNA 15 µL 3 M Na-Acetat 35 µL H<sub>2</sub>O 300 µL 100% Ethanol 20 min, -80°C 20 min, 15000× g, 4°C Pellet 2 × mit 70%igem Ethanol waschen, trocknen ssDNA in 10 µL H<sub>2</sub>O lösen 3. Primer "Annealing" 2 µL "Annealing"-Puffer 2 µL Primer (5 pmol/µL) Auf 50°C erwärmen und in 30 min auf 30°C abkühlen 20 min, Raumtemperatur 4. Sequenzierung 4 Cups mit je 2.5 µL "N"-Mix short pro Reaktion 0.5 µL Polymerase und 2 µL Verdünnungspuffer 5. "Labelling"-Reaktion 3 µL "Labelling"-Mix zur DNA-Lsg. zugeben 0.7 -1.0 µL [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP 2 µL verdünnte Polymerase mischen, 5 min Raumtemperatur 6. Terminationsreaktion je 4.5 µL "Labelling" Ansatz zu "N"-Mix zugeben 5 min, 37°C 5 µL Stop-Lösung zugeben Unmittelbar vor Auftrag auf ein Sequenzgel wurden die Proben für 5 min bei 94° C denaturiert.

## **Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung**

Bei den Sequenzgelen handelte es sich um 6%ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele oder Glycerin-haltige Gele mit einer Dicke von 0.5 mm. Die Glasplatten wurden gründlich gereinigt und mit Ethanol abgewaschen. Die kleinere der beiden Glasplatten wurde mit einer Mischung aus 10 mL Ethanol, 30 µL Binde-Silan und 30 µL Eisessig behandelt, die größere mit 2-3 mL Sigmacote. Als Spacer zwischen den Platten diente 3M Whatman-Papier. Die Glasplatten wurden mit Metallklammern zusammengehalten. Die entgaste und filtrierte Polyacrylamidlösung versetzte man mit TEMED und 10% APS und goß das Gel. Ein Probenkamm wurde mit der glatten Seite nach unten eingesetzt. Die Polymerisation des Gels erfolgte innerhalb einer Stunde. Zur Elektrophorese wurde das Gel in die Apparatur eingespannt, die Kammern mit TBE-Puffer gefüllt und der Kamm aus dem Gel entfernt. Blasen und Harnstoff wurden durch Spülen der Geloberfläche mit Puffer entfernt. Während einem Vorlauf bei einer Spannung von ca. 1.2 kV erwärmte sich das Gel. Nach 1 h wurde die Elektrophorese unterbrochen, die Geloberfläche erneut mit Puffer gespült und der Kamm mit den Zähnen nach unten 1 mm weit in das Gel gesteckt. Nun konnten 1.2 - 2.5 µL der denaturierten Sequenzierungsansätze aufgetragen werden. Die Trennung erfolgte bei ca. 1.5 kV innerhalb von 2 bis 6 Stunden. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt. Zur Entfernung des Harnstoffes und zur Fixierung der Banden wurde das Gel 30 min in 10% Methanol, 10% Eisessig gewaschen. Anschließend trocknete das Gel auf der Glasplatte 1 h bei 80° C. Autoradiographie erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilmes auf das Gel. Die Expositionszeit betrug 16-72 h.

## **Arbeiten mit RNA**

Um die Degradierung von RNA durch RNasen zu vermindern, wurden beim Umgang mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Wasser und Lösungen, die keine organischen Stickstoffgruppen enthielten, wurden vor Gebrauch mit 0.1% DEPC über Nacht inkubiert und autoklaviert. Cups, Skalpelle und Pinzetten wurden 30 min autoklaviert und vor der Benutzung mit DEPC-behandeltem Wasser gespült. Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

## **Gesamt-RNA Isolation aus Rindergewebe**

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Rinderherzgewebe erfolgte nach der Methode von P. Chomczynski und N. Sacchi (1987). Es handelt sich hierbei um eine Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion. Das möglichst frische Gewebe wurde noch auf dem Schlachthof zerteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren um den Abbau der RNA durch RNasen so gering wie möglich zu halten. Es wurde ausschließlich in frisch autoklavierten Gefäßen und unter Verwendung von DEPC behandeltem Wasser und Puffern gearbeitet. Auf Trockeneis wurden ca. 50 mg des gefrorenen Gewebes in ein 2 mL Cup überführt und mit 500 µL Denaturierungslösung versetzt. Homogenisierung des Gewebes erfolgte durch Pottern mit einem

Teflonhomogenisator. Anschließend wurden 50 µL 2 M Na-Acetat, pH 4, 500 µL Phenol und 100 µL Chloroform / Isoamylalkohol 49 : 1 zugegeben. Diese Mischung inkubierte unter Schütteln 10 min bei Raumtemperatur und danach weitere 15 min auf Eis. Zur Phasentrennung zentrifugierte man 20 min bei 15000× g und 4°C. Die wässrige Phase von je 2 Ansätzen wurde in ein neues Cup überführt und mit 1 mL Isopropanol versetzt. Zur Fällung der RNA erfolgte eine Inkubation für 1 h bei –20°C und anschließend eine Zentrifugation für 35 min bei 15000× g und 4°C. Das Pellet wurde in 300 µL Denaturierungslösung gelöst und die RNA erneut mit 300 µL Isopropanol 1 h bei –20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 25 min bei 15000× g und 4°C wusch man das Pellet zweimal mit 1 mL 70%igem Ethanol. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 40 µL DEPC–H<sub>2</sub>O gelöst und bei –20°C gelagert.

## **RNA Agarosegelelektrophorese**

Zur Kontrolle des Degradationsgrades der isolierten RNA wurde eine Agarose–gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1.3 g Agarose in 90 mL heißem Wasser gelöst. Danach gab man 22 mL 37%iges Formaldehyd und 12.3 mL 10× MOPS zu der Agaroselösung und goß diese Mischung schnell und ohne abzusetzen in die Gelkammer, um inhomogene Bereiche im Gel zu verhindern. Die RNA–Proben wurden wie folgt behandelt. 3 µL RNA–Lösung 2.5 µL H<sub>2</sub>O 1 µL 10× MOPS 3.5 µL 37% Formaldehyd 10 µL Formamid 1 µL Ethidiumbromid 15 min 70°C, dann abkühlen auf Eis 2 µL 6× Auftragspuffer zugeben Als Elektrodenpuffer wurde 1× MOPS verwendet. Elektrophorese erfolgte für ca. 4 h bei maximal 80 mA.

## **Southern–Transfer von DNA**

Die Übertragung von DNA–Fragmenten auf Hybond<sup>TM</sup>–N+ Membran erfolgte nach einem von Southern beschriebenen Verfahren (Southern, 1975). Dazu wurde die mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA im Gel denaturiert, indem das Gel zweimal 15 min bei RT unter leichtem Schütteln mit Denaturierungslösung behandelt wurde. Das Gel wurde kurz mit Wasser gespült und nachfolgend zweimal 15 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Nach erneutem Spülen des Gels erfolgte eine 2 minütige Behandlung mit 2× SSC–Puffer. Der Transfer erfolgte mit Hilfe eines Stratagene „Pressure Blotters“. Hierzu wurden zwei auf Gelgröße zugeschnittene und in 2× SSC getränkte Whatmann 3MM Filterpapiere auf einem Sieb zentriert. Darauf wurde eine in Gelgröße zugeschnittene und in 2× SSC getränkte Membran gelegt und mit dem Gel sowie einem in 20× SSC getränkten Schwamm überschichtet. Die Apparatur wurde verschlossen und mit einem Kompressor ein Druck von etwa 75 Torr erzeugt, der für einen Flüssigkeitsstrom durch das Gel sorgte und so die DNA aus dem Gel auf die Membran transferierte. Nach 90 Minuten wurde der Transfer beendet und die DNA auf der Membran fixiert. Dies erfolgte durch zweimaliges „UV–Autocrosslinking“ mit einem Stratagene StrataLinker und durch 10 minütiges Backen der Membran bei 80°C.

## **Radioaktive Markierung der Sonde und Hybridisierung der DNA**

25 ng Sonden–DNA wurden in 50 µL TE–Puffer, pH 8 gelöst und 5 min bei 95°C denaturiert. Diese DNA wurde zu dem "Labelling–Mix" der Firma Amersham pipettiert. Der Reaktionsansatz inkubierte nach Zugabe von 0.7 – 2 µL [ $\alpha$ –<sup>32</sup>P]–dCTP 10 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 5 µL 0.25 M EDTA beendet. Vor der Hybridisierung mußte die DNA erneut 5 min bei 95°C denaturiert werden. Zunächst wurde die Membran gemeinsam mit 200 µL Prähybridisierungslösung pro cm<sup>2</sup> Fläche möglichst blasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und 1 h bei 68°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Hybridisierung konnte die denaturierte Sonden–DNA direkt zum Prähybridisierungsansatz gegeben werden. Der Ansatz inkubierte bei 68°C über Nacht. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde wurde die Membran zuerst 5 min bei Raumtemperatur mit Waschlösung I und anschließend 15 min bei 68°C in Waschlösung II gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde die Membran in Folie eingeschweißt und 2 bis 24 h bei –80°C autoradiographiert.

## **Chemilumineszenzmarkierung von Sonden–DNA**

Maximal 100 ng DNA wurden in 10 µL Wasser gelöst, 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µL "Labelling" Reagenz und 10 µL Glutaraldehydlösung inkubierte der Ansatz 10 min bei 37°C.

## **Southern-Hybridisierung und Detektion von DNA**

Die Hybridisierung und Detektion einer nichtradioaktiven DNA-Sonde erfolgte mit dem "ECL<sup>TM</sup> direct nucleic acid labelling and detection system" (Amersham). Dieses Verfahren beruht auf der Oxidation von Luminol durch Peroxidase unter Entstehung von Licht (Chemilumineszenz). Die Membran wurde mit 250 µL "Blocking" Reagenz pro cm<sup>2</sup> Fläche 1 h bei 42°C abgesättigt. Nach Zugabe der Sonde inkubierte die Membran über Nacht bei 42°C. Zum Ablösen der unspezifisch gebundenen Sonden-DNA wurde die Membran zweimal 20 min bei 42°C in Waschlösung I und anschließend zweimal 5 min bei Raumtemperatur in 2× SSC gewaschen. Zur Detektion der DNA inkubierte die Membran 1 min in einem 1:1 Gemisch aus beiden Detektionslösungen. Nach kurzem Trocknen exponierte der Film für ca. 90 min.

## **Northern-Transfer von RNA**

Die zu untersuchende Gesamt-RNA wurde wie beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei jedoch kein Ethidiumbromid in den Proben enthalten war. Das fertige Gel wurde zum Entfernen des Formaldehyds zweimal 15 min in Wasser und anschließend 5 min in 10× SSC gewaschen. Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die Hybond<sup>TM</sup>-N+ Membran erfolgte mit Hilfe von Kapillarkräften. Dabei handelt es sich um eine von Maniatis beschriebene Standardmethode um RNA über Nacht auf die Membran zu transferieren. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch zweimaliges "UV-Autocrosslinking" und durch 10 minütiges Backen der Membran bei 80°C.

## **Markierung der Sonde mit Fluorescein-11-dUTP**

Wegen der hohen Empfindlichkeit wurde für die Northern Blot Analyse das "Gene Images random prime labelling module" der Firma Amersham eingesetzt. Als Sonde wurden 50 ng DNA auf 2 ng / µL in Wasser verdünnt und 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Eine Mischung aus 10 µL Nukleotid-Mix, 5 µL Nonamer Primer, 14 µL Wasser und 1 µL Klenow Enzym (5 Units) inkubierte auf Eis. Nach Zugabe der denaturierten DNA erfolgte eine 2 stündige "Labelling" Reaktion bei 37°C. Zum Abbruch der Reaktion wurde EDTA bis zu einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben. Die so erhaltene Sonde konnte bei -20°C gelagert werden.

## **Northern-Hybridisierung und Detektion von RNA**

Zur Detektion der RNA wurden das "Gene Images CDP-Star detection module" der Firma Amersham benutzt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese 1 h bei 65°C in 0.125 mL / cm<sup>2</sup> Membran "Rapid-hyb" Puffer prähybridisiert. Die Hybridisierung der RNA mit 2 ng / mL denaturierter DNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 55–60°C unter leichtem Schütteln. Zu diesem Zweck wurde die Membran möglichst blasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Nach erfolgter Hybridisierung mußte unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch zweimaliges Waschen in 100 mL 1× SSC-Puffer mit 0.1% SDS für 20 min bei 60°C entfernt werden. Im Anschluß an die Stringenz-Waschschritte inkubierte die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 0.75 mL Puffer A pro cm<sup>2</sup> Membran mit 10% "liquid blocking" Reagenz. Danach inkubierte die Membran nochmals 1 h bei Raumtemperatur in einer 5000-fachen Verdünnung von Anti-Fluorescein-AP-Konjugat in Puffer A, der außerdem 0.5% Rinderserumalbumin enthält. Ungebundenes Konjugat wurde anschließend durch dreimaliges Waschen in 0.3% Tween 20 in Puffer A entfernt und die Membran nach Abtropfen des Puffers in eine ebene Kammer gelegt. Auf die Membran pipettierte man nun 30–40 µL Detektionsreagenz pro cm<sup>2</sup> Membran und inkubierte 2–5 min. Überschüssiges Reagenz wurde entfernt und die Membran in Folie eingeschlagen. Die Exposition eines Filmes erfolgte für 10–30 min.

## **Reverse Transkription von RNA**

2.5 µg RNA wurden in folgendem Ansatz 5 min bei 70°C denaturiert: x µL RNA (2.5 µg) 3.0 µL A, C, G dT<sub>25</sub> Primer (je 10 pmol) 0.4 µL 0.5 M DTT 0.5 µL RNase-Block 2.5 µL 20 mM dNTP-Lösung x µL DEPC-H<sub>2</sub>O ad 20.5 µL Nach beendeter Denaturierung wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und dann mit 2.5 µL Reverse Transkriptase Puffer und 2 µL Reverser Transkriptase versetzt. Zur Synthese der cDNA inkubierte der Ansatz 1–2 h bei 37°C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C.

Zur Amplifizierung bestimmter Gene aus der cDNA wurden 2 µL des obigen Ansatzes für die PCR eingesetzt.

## **Molekularbiologische Methoden bei *Saccharomyces cerevisiae***

Da es sich bei den Hefen um einzellige ascosporogene Eukaryoten mit 16 Chromosomen im haploiden Genom handelt, unterscheiden sich die molekular-biologischen Methoden und Möglichkeiten von denen bei Bakterien und werden deshalb getrennt behandelt.

### **Isolation von genomischer DNA aus Hefe**

Hefezellen aus 5 mL einer Übernachtskultur in YPD-Medium wurden 5 min bei 8000× g abzentrifugiert, mit 1 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und danach in ca. 100 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zu den Hefezellen gab man 0.3 g Glasperlen und 200 µL Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol 25:24:1. Der Aufschluß der Zellen erfolgte nun während 5 minütigem Vortexen durch die Glasperlen. Anschließend wurden 200 µL TE-Puffer, pH 8.0 zugegeben und zur Phasentrennung 5 min bei 15000× g zentrifugiert. Den Überstand überführte man in ein neues Cup und fällte daraus die DNA durch Zugabe von 1 mL absolutem Ethanol und 30 minütige Inkubation bei –20°C. Zentrifugation für 10 min bei 15000× g ergab ein DNA-Pellet, welches in 100 µL TE-Puffer, pH 8.0 aufgenommen wurde. Um die noch enthaltene RNA abzubauen wurden 10 µg RNase zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert.

### **Isolation von Gesamt-RNA aus Hefe**

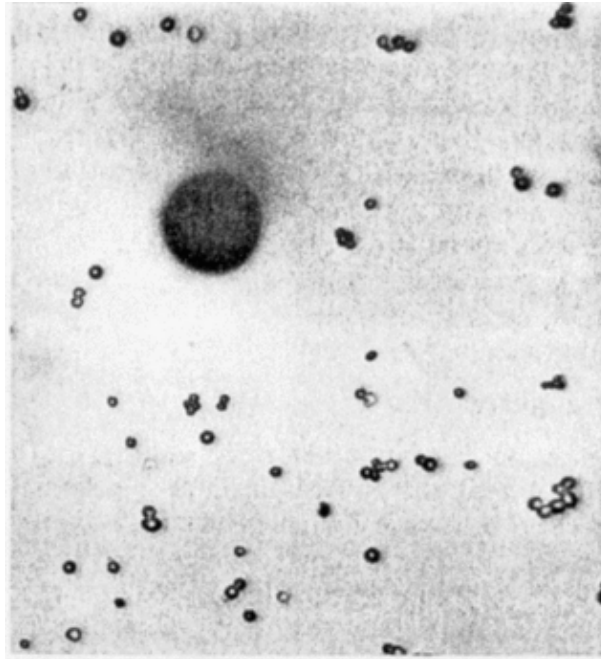
Die Isolation von RNA aus Hefe erfolgte nach der Vorschrift von Schmitt *et al.* (1990). Hefezellen aus 10 mL einer YPD-Übernachtskultur wurden 5 min bei 2000× g pelletiert und anschließend in 400 µL AE-Puffer resuspendiert. Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 40 µL einer 10%igen SDS-Lösung. Nach der Zugabe von 550 µL Phenol, mit AE-Puffer equilibriert, und Vortexen wurden die Ansätze 4 min auf 65°C erhitzt und danach sofort in einer Trockeneis/Ethanol Mischung abgekühlt. Die wäßrige Phase überführte man nach Zentrifugation für 2 min bei 15000× g in ein neues Cup. Die Fällung der RNA erfolgte nach Zugabe von 60 µL einer 3 M Na-Acetatlösung und 1650 µL absolutem –20°C kaltem Ethanol für 1 h bei –20°C. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 15000× g und 4°C pelletiert, mit 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst und bei –20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

### **Deletion von Genen in Hefe**

Die Deletion eines Gens der Cytochrom c Oxidase sollte durch homologe Rekombination auf chromosomaler Ebene erfolgen. Dazu wurde das Gen inklusive seiner flankierenden Regionen mit Hilfe genspezifischer Primer aus genomischer Hefe-DNA PCR-amplifiziert und in pUC18 kloniert. Anschließend wurde das offene Leseraster des Gens durch ein Histidin Markergen ausgetauscht. Dieses Konstrukt transformierte man in Hefezellen, wo dann statistisch homologe Rekombination zwischen der DNA des Konstrukts und dem Hefegenom stattfindet. Man erhält dadurch diploide, heterozygote Hefestämme. Die homozygoten, haploiden Stämme erhält man durch anschließende Sporulation der Zellen und Trennung der Tetraden.

### **Sporulation von diploiden Hefezellen**

Die Sporulation der Hefezellen erfolgte sowohl auf Platten wie auch in flüssigem Medium. Sporulation auf Agarplatten: Zellen des fraglichen Hefestammes wurden als YPD-Übernachtskultur bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600nm</sub> = 2.5 – 3 gezogen. Zellen von 1 mL dieser Kultur wurden 5 min bei 1000× g abzentrifugiert und mit 5 mL sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet resuspendierte man in 1 mL Sporulationsmedium und strich diese Suspension möglichst dicht auf Sporulationsplatten aus. Diese Platten inkubierten 4 Tage bei 25°C. Sporulation in Flüssigkulturen: Die Zellen wurden analog behandelt, jedoch 3 Tage bei 30°C und 350 rpm in 1 mL Sporulationsmedium geschüttelt. In beiden Fällen wurde die

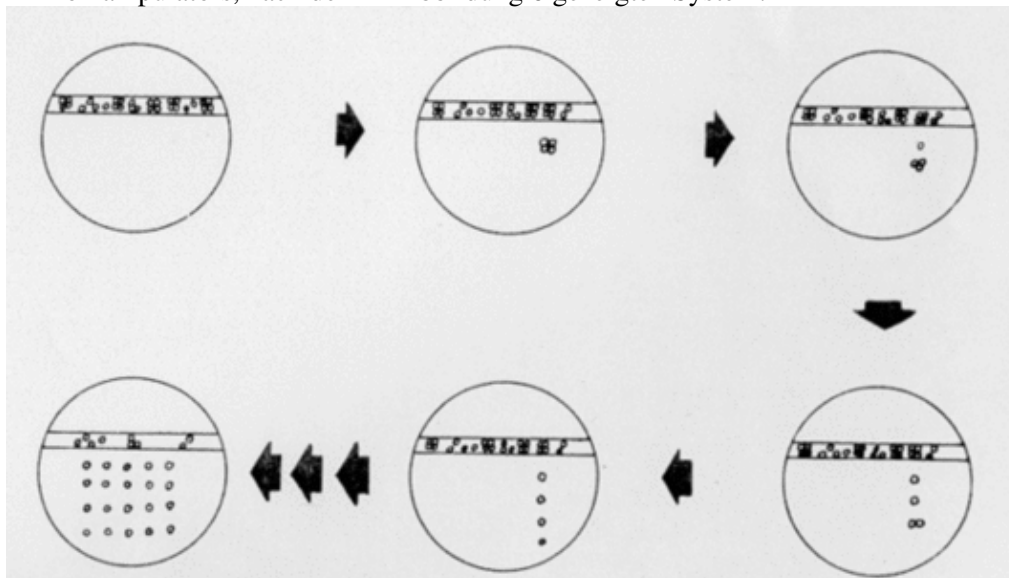


Sporenbildung mikroskopisch überprüft.

**Abb.5:** Abbildung der Videoaufnahme der Tetraden während der Dissektion mit dem Mikromanipulator. Rechts neben der Mikronadel des Manipulators ist eine Tetrade aus vier Sporen zu erkennen.

### Tetradentrennung der Ascussporen

Die Tetradentrennung erfolgte im Labor von Prof. Entian am Biozentrum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt. Den Sporulationsplatten wurde eine Impföse mit Zellen entnommen und einem Zymolyase-Verdau unterworfen, um die Ascuswand aufzulösen. Dazu vereinigte man 50  $\mu$ L Zymolyase Stammlösung, 50  $\mu$ L Wasser und die Hefezellen. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur beendete man den Verdau durch Zugabe von 800  $\mu$ L Wasser. Ein Teil dieser Suspension wurde auf eine YPD-Platte ausgestrichen. Die Tetradentrennung erfolgte mit Hilfe eines Singer MSM Mikromanipulators, nach dem in Abbildung 6 gezeigten System.



**Abb.6:** Schematische Darstellung der schrittweisen Trennung der vier Sporen einer Tetrade.

Die Platten inkubierten eine Woche bei 30°C. Anschließend wurden die aus den Sporen gewachsenen haploiden Kolonien auf Selektionsplatten umgesetzt.

## **Transformation von DNA in Hefe**

Die Transformation der Hefen erfolgte mit Hilfe von Lithiumacetat, beschrieben von Ito *et al.* (1983). Hefezellen aus 0.5 mL einer YPD–Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation für 10 s bei 15000× g pelletiert, der Überstand dekantiert und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µg Heringssperma–DNA und 1 µg der zu transformierenden linearen DNA zugegeben. Nach Zugabe von 500 µL PLATE–Puffer inkubierte der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur.

## **Selektion der Transformanten**

Bei der Deletion eines Gens durch homologe Rekombination wurde das offene Leseraster des Gens durch ein *HIS3* Markergen, welches einen Schritt der Synthese der Aminosäure Histidin kodiert, ersetzt. Selektion der Transformanten erfolgte mit Hilfe eines Selektionsmediums in dem diese Aminosäure fehlte, in diesem Fall "drop out –His". Dazu wurden 50 µL Zellsuspension vom Boden des Cups des Transformationsansatzes auf Platten mit Selektionsmedium ausgestrichen und diese 2 Tage bei 30°C inkubiert.

## **Proteinchemische Methoden**

### **Anzucht von Hefezellen im Fermenter**

Zellen der verschiedenen Hefestämme wurden in 10 L, 30 L und 100 L Fermentern im Labor von Prof. Buckel, Fachbereich Biologie, Philipps–Universität Marburg, gezogen. Die Anzucht erfolgte in nichtfermentierbaren YLac–Medium bei 30°C, 250 rpm und größtmöglicher Sauerstoffzufuhr. Zum Animpfen wurden Vorkulturen im selben Medium benutzt, die sich in der späten exponentiellen Wachstumsphase befanden. Für den 100 L Fermenter wurden 3 L Vorkultur verwendet. Die Ernte der Zellen erfolgte in der frühen stationären Wachstumsphase mittels einer Durchflußzentrifuge. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei –80°C gelagert.

### **Aufnahme von Wachstumskurven**

Die Wachstumskontrolle von verschiedenen Hefestämmen erfolgte in 150 mL YPD– oder YLac–Kulturen. Sie inkubierten bei 250 rpm und 30°C. Die Proben für die Dichtemessungen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspension bei 600 nm bestimmt.

### **Aufschluß von Hefezellen mit der Glaskugelmühle**

Zum Zellaufschluß wurden Hefezellen in einem Volumen Puffer suspendiert und mit der gleichen Menge Glaskugeln in den Aufschlußbehälter gegeben. Dieser mußte möglichst blasenfrei befüllt werden, um allzu starke Schaumbildung zu vermeiden. Der Zellaufschluß erfolgte 5 mal für 1 Minute mit Kühlintervallen von 2 min durch Eiswasser aussen um den Aufschlußbehälter.

## **Isolation von Mitochondrien aus Hefe**

### **Mitochondrien für die zweidimensionale Gelelektrophorese**

Für die Isolation von Mitochondrien für die Gelelektrophorese wurden 50 – 100 g Hefezellen eingesetzt die zuvor nicht eingefroren worden waren. Das Aufschliessen erfolgte in der Glaskugelmühle in einem 400 mM Sucrose enthaltenden Puffer. Zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugierte man 20 min bei 4000× g. Die Mitochondrien wurden aus diesem Überstand durch Zentrifugation für 40 min bei 20000× g gewonnen. Aliquots der so erhaltenen Mitochondriensuspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.



## **Isolation von Mitochondrien für Aktivitätsmessungen**

Die Mitochondrien für Aktivitätsmessungen wurden analog der Methode für Mitochondrien zur 2D-Gelelektrophorese isoliert. Die Hefezellen wurden nach dem Ernten nicht eingefroren. Die Mitochondrien wurden für die Messungen nur einmal auf Eis aufgetaut.

## **Isolation von Mitochondrien für die Cytochrom c Oxidase Isolation**

Für eine Isolation wurden 500 – 600 g Hefezellen eingesetzt. Zur Isolation der Mitochondrien wurden die Hefezellen portionsweise in der Glaskugelmühle in Puffer I aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen dekantierte man anschließend vorsichtig von den Glasperlen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde 10 min bei 4000× g zentrifugiert. Die Mitochondrien erhielt man durch erneute Zentrifugation des Überstandes für 40 min bei 20000× g. Der Proteingehalt der Mitochondrien-suspension in Puffer I wurde nach Biuret bestimmt, der Gehalt an Cytochrom c Oxidase photometrisch. Die Mitochondrien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei –80°C gelagert werden.

## **Ankonzentrieren von Cytochrom c Oxidase aus Mitochondrien**

Da die verwendeten Hefestämme nur sehr wenig COX produzierten, diese aber immunologisch detektiert werden sollte, mußte die COX in den Proben ankonzentriert werden. Gleichzeitig wurde so das COX/Protein Verhältnis für die Gelelektrophorese verbessert. Hefemitochondrien wurden in Sucrose-Puffer suspendiert und auf Eis 3 mal 1 min bei 30% Intensität beschallt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15000× g erhielt man ein Membranpellet, in dem sich hauptsächlich COX befand. Dies wurde photometrisch überprüft. Sollte der Überstand als Kontrolle dienen, konnten die enthaltenen Protein mit TCA, wie bei der Proteinbestimmung beschrieben, gefällt werden. Alle Pellets wurden in 200 µL Probenpuffer aufgenommen.

## **Isolation von Cytochrom c Oxidase aus Hefe**

Die Isolation von Cytochrom c Oxidase aus Hefe erfolgte nach der Methode von Geier *et al.* (1995). Die zuvor erhaltenen Mitochondrien wurden auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/mL in Puffer I, der 1.1% Triton X-100 enthielt, verdünnt. Während der gesamten Präparation war 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor in den Puffern enthalten. Die Lösung zentrifugierte 1 h bei 100000× g. Das erhaltene Pellet wurde mit Puffer II in einer Proteinkonzentration von 20 mg/mL homogenisiert. Bei einer Triton X-100 Konzentration von 2.2% wurden die Atmungskettenkomplexe III und IV aus der Membran extrahiert und die Lösung erneut 1 h bei 100000× g zentrifugiert. Durch Zugabe einer 500 mM Na-Phosphatlösung wurde der Überstand auf eine Konzentration von 100 mM Na-Phosphat gebracht und auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Das Hydroxylapatitvolumen wurde entsprechend der Bindungskapazität von 6 nmol/mL Komplex III gewählt und betrug ca. 50 mL des Säulenmaterials, equilibriert mit Puffer IV. Elution der Cytochrom c Oxidase erfolgte mit einem Säulenvolumen Puffer IV. Das Eluat wurde auf eine Phosphatkonzentration von 70 mM verdünnt und auf eine zweite Hydroxylapatitsäule, equilibriert mit Puffer VII, aufgetragen. Die Bindungskapazität für Cytochrom c Oxidase beträgt 4 nmol pro mL Hydroxylapatit, dieses entsprach einem Säulenvolumen von ca. 50 mL. Die Säule wurde mit 1 Volumen Puffer VII gewaschen und das Enzym anschließend mit 1 Volumen Puffer VIII eluiert. Die so erhaltene Cytochrom c Oxidase Lösung wurde mit Hilfe einer Druckdialysekammer auf ein Volumen von 10 – 15 mL eingeengt. Die folgende Gelfiltration an einer Sepharose CL-6B Säule in Puffer IX diente der Abtrennung von Na-Phosphat und von überschüssigem Triton X-100. Die Cytochrom c Oxidase Fraktionen wurden vereinigt und mit Centricon Konzentratoren stark eingeengt. Nach Versetzen der Enzymlösung mit 10% Glycerin wurden Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Ausgehend von 5 g Membranprotein, in denen ca. 40 mg Cytochrom c Oxidase enthalten waren, konnten etwa 10 mg Enzym isoliert werden. Das Säulenmaterial Hydroxylapatit wurde nicht regeneriert sondern verworfen.

## **Spektrophotometrische Bestimmung von Cytochrom c Oxidase**

Für die Konzentrationsbestimmung von Cytochromen in Cytochrom c Oxidase wurden Differenzspektren, dithionitreduziert gegen luftoxidiert, oder Absolut-spektren, oxidiert und dithionitreduziert, aufgenommen. Für die Bestimmung des Cytochrom aa<sub>3</sub> -Gehaltes von Lösungen während der Isolation wurde ein Aliquot in 5% Triton X-100 enthaltendem Puffer gelöst und ein Differenzspektrum von 650 bis 500 nm aufgenommen. Absolutspektren des gereinigten Enzyms wurden in Cholatpuffer von 650 bis 250 nm aufgenommen. Es

gelten folgende Extinktionskoeffizienten (Von Jagow und Klingenberg, 1972; Wikström *et al.*, 1981):

$$D_{e\ 603-630\text{nm}} = 24\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}\ (\text{red.-ox.})$$

$$D_{e\ 603-650\text{nm}} = 40\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}\ (\text{red.})$$

$$D_{e\ 443-490\text{nm}} = 204\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}\ (\text{red.})$$

## **SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS–PAGE)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Acrylamid–Gelelektrophorese Systeme zur Proteintrennung verwendet.

### **SDS–PAGE nach Kadenbach**

Dieses Gelsystem (Kadenbach *et al.*, 1983) beruht auf einer Modifikation des diskontinuierlichen Trennsystems von Laemmli (1970). Durch Zusatz von Harnstoff wurde die Trennleistung der Gelmatrix erhöht (Downer *et al.*, 1976). Die Gele enthielten 18.75% Acrylamid und 6 M Harnstoff. Die Gelelektrophorese wurde in vertikalen Flachgel–Apparaturen mit einer Größe von  $0.75 \times 120 \times 220\ \text{mm}$  durchgeführt. Trenngel: 2.9 g Harnstoff 11.3 g Trenngelpuffer 7.8 g Acrylamidlösung 50  $\mu\text{L}$  10% APS 10  $\mu\text{L}$  TEMED Sammelgel: 4 mL Sammelgelpuffer 1 mL Acrylamidlösung 25  $\mu\text{L}$  10% APS 5  $\mu\text{L}$  TEMED Nachdem die Polymerisation des Acrylamids durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet worden war, wurde die Trenngellösung bis etwa 3 cm unterhalb der oberen Kante in die Gelkammer gegossen und sofort mit der Sammelgellösung überschichtet. Für analytische Gele wurde ein Teflonkamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt. Nach beendeter Polymerisation wurde das Gel in die Apparatur eingespannt und deren Kammern mit Elektrodenpuffer befüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült. Die Proteinproben denaturierten vor dem Auftrag 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Es konnten 40  $\mu\text{g}$  Protein in einem Volumen von 20 – 35  $\mu\text{L}$  pro Spur aufgetragen werden. Die Proben liefen für 1 h bei 80 – 100 V in das Sammelgel ein. Anschließend folgte die Elektrophorese bei 220 V über Nacht. Die Elektrophorese war beendet, wenn der Farbmarker aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde anschließend unter Schütteln 1 h in Coomassie–Lösung gefärbt und fixiert und danach bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden wieder entfärbt.

### **SDS–PAGE nach Schägger und Von Jagow**

Trenngel: 10 mL Acrylamidlösung 10 mL Gelpuffer 10.8 g Harnstoff 150  $\mu\text{L}$  10% APS 15  $\mu\text{L}$  TEMED ad 30 mL mit  $\text{H}_2\text{O}$  Spacergel: 3.05 mL Acrylamidlösung 5 mL Gelpuffer 75  $\mu\text{L}$  10% APS 7.5  $\mu\text{L}$  TEMED ad 15 mL mit  $\text{H}_2\text{O}$  Sammelgel: 1 mL Acrylamidlösung 3.1 mL Gelpuffer 100  $\mu\text{L}$  10% APS 10  $\mu\text{L}$  TEMED ad 12.5 mL mit  $\text{H}_2\text{O}$  Bei den verwendeten Schägger–Gelen (Schägger *et al.*, 1987) handelt es sich um Gele mit 16.5% Acrylamid–Bisacrylamid (T) und 3% „Crosslinker“ (nach Hjerten, 1962). Es wurden dieselben Apparaturen wie bei den Kadenbach–Gelen verwendet. Das Trenngel wurde nach dem Gießen sofort mit dem Spacergel überschichtet. Zur Ausbildung einer glatten Oberfläche überschichtete man dieses während der Polymerisation mit Wasser. Nach dem Aushärten des Spacergels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte wie oben beschrieben. Die Proben liefen 1 h bei 30 V in das Gel ein und wurden über Nacht bei 180 V getrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie.

### **Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination aus nativer Gelelektrophorese in der ersten Dimension und anschließender SDS–PAGE in der zweiten Dimension (Schägger *et al.*, 1991). Zur Trennung der Atmungskettenkomplexe wurde ein Trenngel mit einem Gradienten von 5–13% Acrylamid gegossen und mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Die Dicke des Gel betrug 1.6 mm, und pro Spur konnten 200  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen werden. Die Mitochondrien wurden vor dem Auftrag in folgendem Ansatz solubilisiert: 2  $\mu\text{L}$  10% Dodecylmaltosidlösung 20  $\mu\text{L}$  1 M Aminocaprinsäure in 50 mM Bis–Tris–HCl, pH 7.0 pro 200  $\mu\text{g}$  Protein Nach Inkubation für 30 min auf Eis schloss sich eine 15 minütige Zentrifugation bei  $100000\times\ \text{g}$  an. Der Überstand wurde mit einem halben Volumen 5%iger Serva Blau G–Lösung versetzt und konnte nun auf

das Gel aufgetragen werden. Die elektrophoretische Trennung erfolgte innerhalb von 3–4 h bei 500 V und 4°C, nachdem die Proben zunächst bei 100 V in das Gel einliefen. Nach der Hälfte der Elektrophorese wurde der 0.02% Serva Blau enthaltende Kathodenpuffer gegen einen 0.002% Serva Blau enthaltenden Kathodenpuffer ausgetauscht. Nach beendeter Elektrophorese wurde der Bereich des Gels, auf dem die Cytochrom c Oxidase zu sehen war, in 1 cm breite Streifen geschnitten. Zur Denaturierung der Proteinuntereinheiten für die zweite Dimension inkubierten die Gelstreifen 1 h in 1% SDS und 1% Mercaptoethanol. Danach wurden die Streifen an die Stelle des Sammelgels auf Öhrenplatten gelegt und die Gelapparatur zusammengebaut. Überschüssiges SDS und Mercaptoethanol wurden mit Whatman-Papier entfernt. Ein Trenngel mit einer Konzentration von 16.5% T, 3% C + 6 M Harnstoff wurde bis 1 cm unter den Gelstreifen aus der ersten Dimension gegossen und während der Polymerisation mit Wasser überschichtet. Später wurde der Zwischenraum mit einem 10% T, 3% C + Glycerin Gel ausgegossen und der native Gelstreifen von oben festgedrückt, um Luftblasen zu entfernen. Direkt um den Gelstreifen wurde das native Gel der ersten Dimension gegossen, um Zwischenräume auszufüllen. Die Elektrophorese erfolgte, nach Einlauf bei 50 mA für 1 h, bei 115 V über Nacht. Die Gele wurden 45 min in Essigsäure / Methanol fixiert und anschließend mit Coomassie oder Silberanfärbung (Oakley, 1980) gefärbt.

## Polarographische Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der Cytochrom c Oxidase in solubilisierten Mitochondrien wurde polarographisch gemessen. Diese Methode beruht darauf, den Sauerstoffverbrauch des Enzyms im Fließgleichgewicht ("steady state") potentiometrisch mit einer Clark-Sauerstoffelektrode zu verfolgen (Ferguson-Miller *et al.*, 1976 und 1978). Zu diesem Zweck inkubierten Hefemitochondrien mit einer Häm aa<sub>3</sub>-Konzentration von 10–25 nM in einem Detergenz enthaltenden Puffer 15 min auf Eis. Die Cytochrom c Oxidase Aktivität wurde in einer Rührzelle bei 25°C, 18.5 mM Tris-Ascorbat, pH 7.4 und Konzentrationen von 0.25 – 100 µM Cytochrom c gemessen. Nukleotid-Effekte wurden in Gegenwart von 5 mM Nukleotid gemessen. Bei Messungen mit ATP wurde ein regenerierendes System eingesetzt, um die ATP-Hydrolyse zu kompensieren. Dazu wurde dem Messpuffer 20 U / mL Pyruvatkinase und 10 mM Phosphoenolpyruvat hinzugefügt. Der Turnover (TN) der COX wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{verbrauchter Sauerstoff (1/4 O}_2\text{) } [\mu\text{M}] / \text{Konzentration COX } [\mu\text{M}] \times \text{Zeit [s]}$$

Bei der Auswertung dieser Messungen können Fehler entstehen. Ein Fehler von 0.5 mm bei der Bestimmung der Steigung führt zu einer Abweichung des Turnovers von 7 s<sup>-1</sup>. Der Gehalt von endogenem Cytochrom c in Mitochondrien wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Bei allen Punkten der Geraden handelt es sich um den Mittelwert aus vier Messungen.

## Proteinbestimmung nach Biuret

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von z.B. Mitochondriensuspensionen wurde die modifizierte Biuret-Methode (Kadenbach, 1966) angewandt. 100 µL der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit Wasser auf 2 mL aufgefüllt und die Proteine durch Zugabe von 200 µL 3 M Trichloressigsäure 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1000× g löste man das Proteinpellet in 2 mL Biuret Reagenz und inkubierte 15 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion dieser Lösung wurde nach Zugabe von 2 mL Wasser bei 546 nm gemessen (E<sub>546</sub>). Anschließend wurde der Proteinkomplex durch Zugabe von KCN zerstört und nach 5 min die unspezifische Trübung der Lösung durch Messung der Extinktion bestimmt (E<sub>KCN</sub>). Der Proteingehalt der Probe berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$[(E_{546} - E_{KCN}) - E_{\text{Blindwert Biuretreakenz}}] \times 7 = \text{mg Protein/Probe}$$

## Herstellung von Hydroxylapatit als Säulenmaterial

Hydroxylapatit zur Aufreinigung von Hefe Cytochrom c Oxidase wurde nach Tiselius (1956) mit Modifikationen von Bernardi (1973) selbst hergestellt. In einem 5 L Becherglas wurden 250 mL 1M NaCl-Lösung vorgelegt und auf 70°C erhitzt. Innerhalb von 8–10 h tropften unter Rühren je 2 L einer 0.5 M CaCl<sub>2</sub> – und einer 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> –Lösung zu. Das Präzipitat wurde über Nacht stehengelassen und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zum Waschen des Präzipitats gab man 2.5 L Wasser zu

und saugte nach Absitzen des Präzipitats erneut den Überstand ab. Die Umwandlung des Brushits in Hydroxylapatit erfolgte durch Zugabe von 2.5 L Wasser und 40 g festem Natriumhydroxid und anschließendem Erhitzen der Suspension auf 90°C innerhalb von 45 min. Die Suspension wurde 1 h bei 95–97°C gekocht. Danach ließ man das Präzipitat absitzen und saugte den Überstand heiß ab. Zum Entfernen von Hydroxylapatit-Kristallen der falschen Körnung wurde das Präzipitat zweimal mit 2.5 L Wasser aufgeschlämmt und nach 3 min der Überstand samt „fines“ abgesaugt. Anschließend wurden 2.5 L Wasser mit 100 mL 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  zugegeben und die Suspension innerhalb 45 min auf 80°C erhitzt. Nach Absaugen des Überstandes wiederholte man diesen Vorgang. Zuletzt wurde das Säulenmaterial in 50 mM Na-Phosphat aufgenommen und konnte 4–6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

## **Protein-Blotting**

Durch SDS-PAGE getrennte Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür verwendete man eine Semi-Trocken Blotapparatur. Es wurden drei verschiedene Elektrodenpuffer zum Anfeuchten von jeweils drei Lagen Filterpapier benötigt, Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II (Kyhse-Anderson, 1984). Die Nitrocellulosemembran wurde vor dem Zusammenfügen der Apparatur mit Anodenpuffer I angefeuchtet und möglichst blasenfrei auf das Gel gelegt. Die Transferzeit betrug 60 min bei 160 mA. Die transferierten Proteine wurde anschließend durch reversible Anfärbung mit Amidoschwarz auf der Membran sichtbar gemacht und die Lage der Banden mit Kugelschreiber markiert.

## **Immunofärbung von Proteinblots**

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran inkubierte diese über Nacht bei 4° C oder 2 h bei Raumtemperatur in 1%iger BSA-Lösung in PBS. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe der mit PBS 1:200 verdünnten monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörper inkubierte der Blot 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Reste der Antikörper wurden danach durch wiederholtes Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Eine weitere Inkubation mit in PBS-Puffer 1:1000 verdünnten AP-konjugierten Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Immunglobulinen folgte. Nach Waschen des Blots wurde der Substratpuffer mit BCIP und NBT (De Blas and Cherwinski, 1983; Blake *et al.*, 1984) zugegeben und die Reaktion mit Wasser gestoppt, sobald deutliche Banden sichtbar waren, spätestens jedoch nach 10 min.

---

...

# Ergebnisse

...

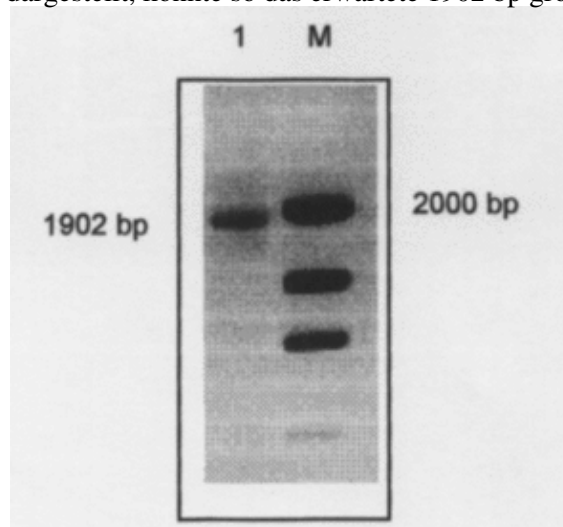
## ***Saccharomyces cerevisiae* als genetisches System**

Hefen haben sich als ideales System für molekularbiologische Studien erwiesen. Sie zeigen schnelles Wachstum, haben ein effizientes DNA Transformationssystem und eine genau definierte Genetik. Bestimmte Plasmide können sich in Hefe entweder selbst replizieren, oder die DNA kann durch homologe Rekombination direkt in das Genom integriert werden. Anders als die meisten Mikroorganismen sind Hefen sowohl im haploiden als auch im diploiden Zustand stabil, wobei sich haploide Stämme leicht durch Sporulation und anschließende Trennung der Tetraden erzeugen lassen. *S. cerevisiae* besitzt ein haploides Set von 16 Chromosomen. Das Genom von Hefe wurde vollständig sequenziert (Mewes *et al.*, 1997). Die Chromosomen besitzen Größen von 200 bis 2200 kb mit einer Gesamtlänge von 13,000 kb, die für 6300 Gene kodieren. Hefe-DNA enthält insgesamt nur 221 Introns, keines davon im *COX13* Gen. Dominante Gene werden mit kursiven Großbuchstaben benannt, während rezessive oder deletierte Gene mit kursiven, kleinen Buchstaben beschrieben werden.

## **Erzeugung der Hefe Deletionsmutanten *d cox13::HIS3***

### **Amplifikation und Klonierung des *COX13* Gens aus Hefe**

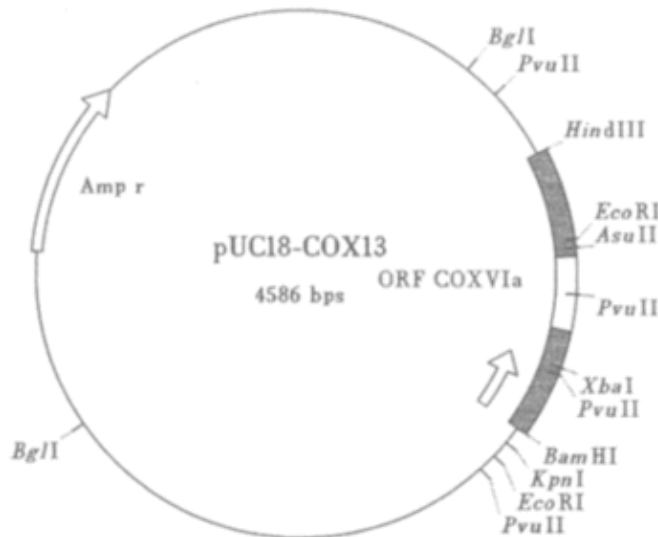
Das Gen *COX13* kodiert in Hefe die Untereinheit VIa der Cytochrom c Oxidase. *COX13* liegt als "single copy" Gene im haploiden Hefegenom vor. Das Gen und seine flankierenden Regionen wurde 1993 kloniert, sequenziert (Taanman and Capaldi, 1993) und auf dem linken Arm des Chromosoms VII in der Position 144812 bis 145198 nt lokalisiert (Coglievina *et al.*, 1997). Die Sequenzinformationen, die für die Amplifikation und Klonierung des Gens notwendig waren, wurden unter der Nummer X72970 der GenBank™ EMBL Datenbank entnommen. Die vollständige Sequenz ist dem Anhang zu entnehmen. Die Amplifikation des Gens erfolgte mit Hilfe von PCR aus genomischer Hefe-DNA. Diese wurde aus Zellen des Hefestammes SFY526 isoliert und photometrisch quantitiert. Da die Deletion des *COX13* Gens durch homologe Rekombination erfolgen sollte, mußte das Gen inklusive seiner 5'- und 3'-flankierenden Regionen amplifiziert werden. Dazu wurden die PCR-Primer so ausgesucht, daß sie möglichst im äußeren Bereich des 1959 bp langen Gens lagen. Außerdem wurde die Lage der Primer so gewählt, daß durch den Austausch weniger Basen Schnittstellen für die Klonierung eingefügt wurden. Der "forward" Primer befand sich demnach an der Position 23–44 b des Gens und enthielt eine *BamH* I Schnittstelle, während der "reverse" Primer die Position 1906–1924 b innehatte und eine *Hind* III Schnittstelle enthielt. Zur Amplifikation des Gens wurde eine "Hotstart" PCR durchgeführt. Die ersten fünf Zyklen erfolgten bei einer "Annealing"-Temperatur von 60°C, woran sich 30 weitere Zyklen mit einer "Annealing"-Temperatur von 66°C anschloßen. Da es sich um ein relativ langes DNA Fragment handelt, betrug die Elongationszeit 150 s. Wie in Abbildung 7 dargestellt, konnte so das erwartete 1902 bp große Fragment des *COX13* Gens



amplifiziert werden.

**Abb.7: Ergebnis der PCR zur Amplifikation des *COX13* Gens.** Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit 5 µL Ethidiumbromid aufgetrennt. Spur 1: 5 µL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 1902 bp Fragmentes des *COX13* Gens; Spur M: 4 µL DNA-Mass-Ladder. Die Größen der entscheidenden Banden sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Nach dem Doppelverdau des PCR-Fragmentes mit *BamH* I und *Hind* III wurde dieses in definierter Richtung "sticky end" in die "multiple cloning site" des zuvor mit den selben Enzymen verdauten und dephosphorylierten Vektors pUC18 kloniert und in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Positive Klone wurden durch blau/weiß Screenen selektiert und nach Isolation der Plasmid DNA durch vier verschiedene Restriktionsverdaue mit den Enzymen *Bgl* I, *EcoR* I, *Pvu* II und *Xba* I charakterisiert, wobei alle erhaltenen DNA-Fragmente der berechneten Größe entsprachen. Das so erhaltene Plasmid heißt pUC18-*COX13*. Abbildung 8 zeigt eine Genkarte des Plasmides mit den entscheidenden Schnittstellen.



**Abb.8: Karte des Plasmides pUC18-*COX13* mit den verwendeten Schnittstellen.** Das PCR-Fragment mit den flankierenden Regionen des *COX13* Gens ist dunkel schattiert, während der ORF weiß dargestellt ist. Die Orientierung des *COX13* Gens im Plasmid ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

### Austausch des *COX13* ORF gegen ein Markergen

Um später die Hefestämme mit der Deletion selektieren zu können, sollte der ORF des *COX13* Gens durch ein Histidin Markergen ausgetauscht werden, welches dann den Histidin negativen Elternstamm komplementiert. Dieses *HIS3* Gen wurde in dem Plasmid pJJ217 (s. Anhang) erhalten und daraus durch Restriktionsverdaue mit *Xba* I und *Sma* I als 1773 bp Fragment isoliert. Gleichzeitig wurde aus dem Plasmid pUC18-*COX13* der ORF des *COX13* Gens durch Herausschneiden eines 477 bp großen Fragmentes mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Sfu* I entfernt. Dazu mußte zunächst der *Sfu* I Verdau des Plasmids pUC18-*COX13* durchgeführt werden, da dieses Enzym "sticky ends" erzeugt, die Klonierung auf dieser Seite jedoch "blunt end" erfolgen sollte, um mit dem *Sma* I geschnittenen Insert kompatibel zu sein. Der von *Sfu* I erzeugte 5'-Überhang wurde hierzu mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Nach anschließendem Verdau des Plasmids pUC18-*COX13* mit *Xba* I konnte die Ligation des *HIS3* Markergens in das Plasmid pUC18-*COX13* erfolgen. Das Plasmid heißt nun pUC18-*d cox13::HIS3*. Richtige Klone wurden durch Kartierung mit den Restriktionsenzymen *BamH* I, *Kpn* I, *EcoR* I, *Pvu* II und *Pst* I charakterisiert. Das Schema der Klonierungsschritte ist in Abbildung 9 dargestellt.

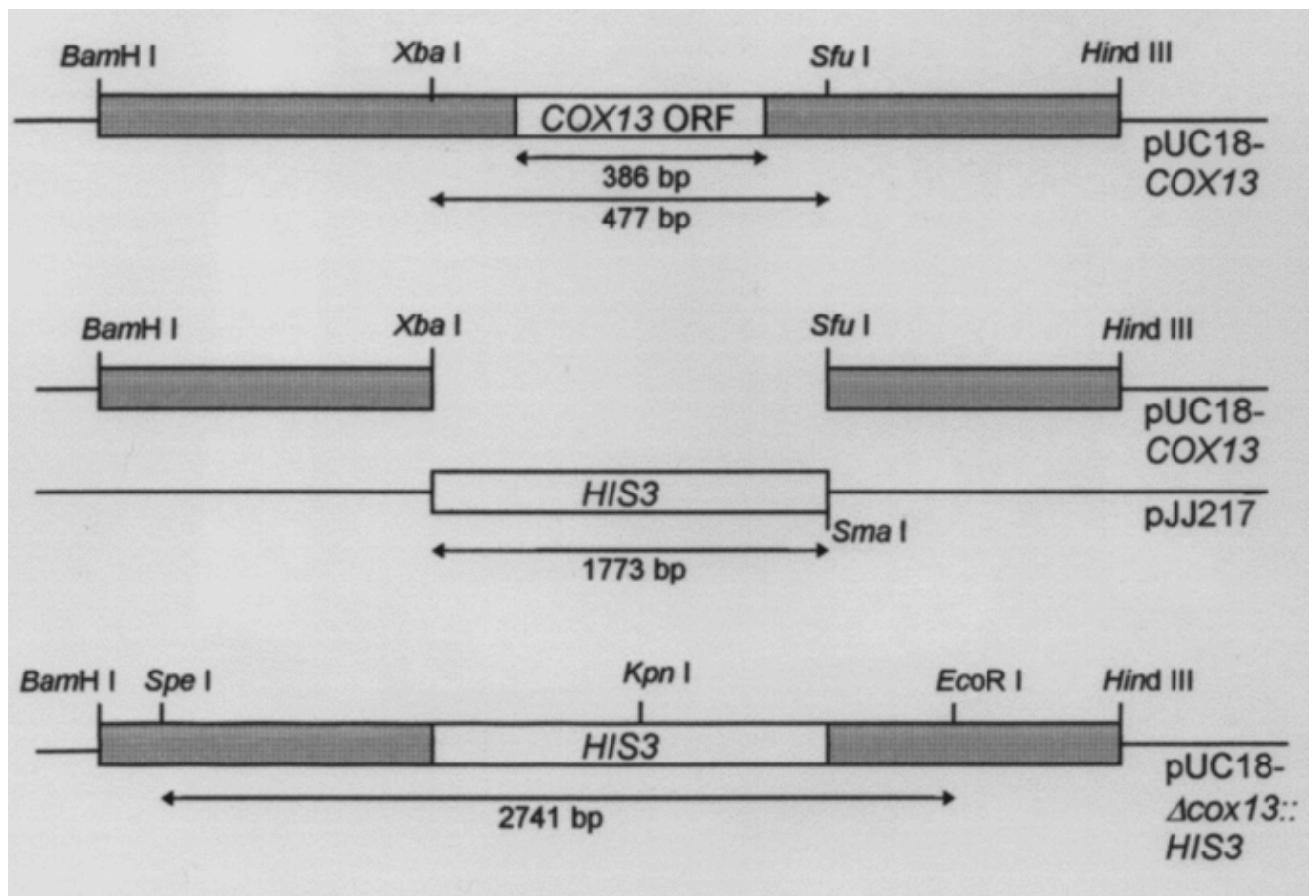


Abb.9: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Deletion des COX13 ORF. Nur die verwendeten Schnittstellen sind eingezeichnet.

### Transformation des *d cox13::HIS3* Kontruktes in Hefe

Das nun vorliegende DNA-Fragment ist ein Konstrukt aus Histidin Markergen, umgeben von den flankierenden Regionen des *COX13* Gens. Dieses kann linear in Hefe transformiert werden, wo dann statistisch homologe Rekombination mit den flankierenden Regionen des *COX13* Gens im Hefegenom stattfindet. Dadurch wird einmal im diploiden Genom der ORF des *COX13* Gens durch das Histidin Markergen ausgetauscht, wie Abbildung 10 zeigt. Man erhält dann diploide, heterozygote Hefestämme, die sowohl das *COX13* Gen als auch das Histidin Markergen enthalten.

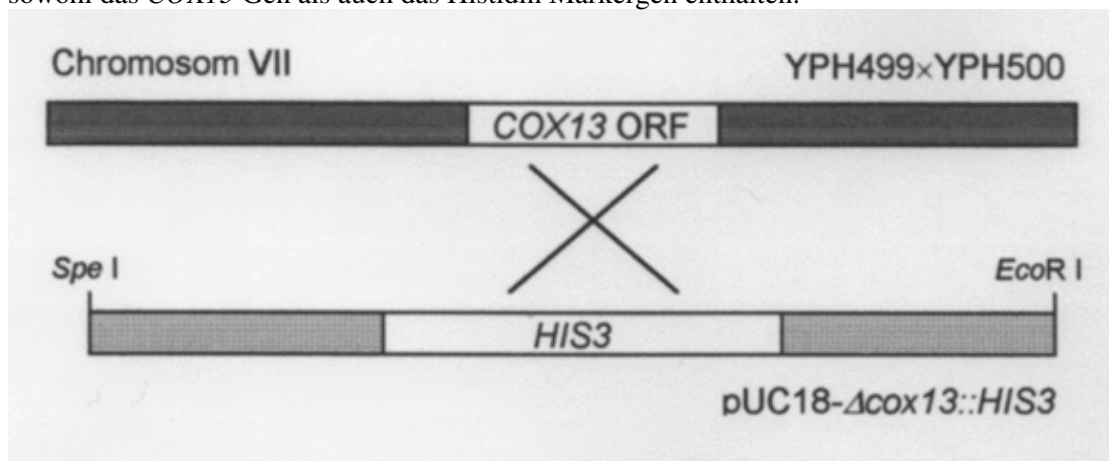


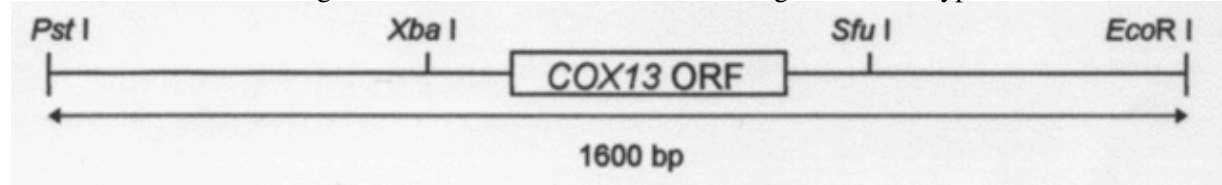
Abb.10: Schema der homologen Rekombination zwischen Hefegenom und dem Deletionskonstrukt. Nur verwendete Schnittstellen sind eingezeichnet.

Für die Transformation der Hefe wurde das Plasmid pUC18-*d cox13::HIS3* mit *Spe* I und *Eco* R I verdaut. Dabei entstanden Fragmente von 2969 bp (Plasmid) und 2741 bp (Insert) Länge, die nicht elektrophoretisch

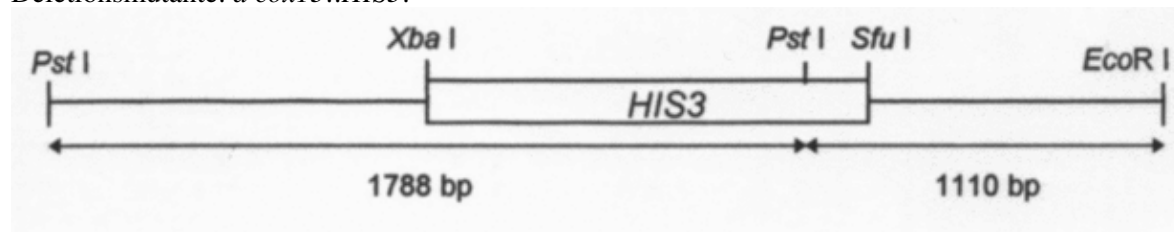
getrennt werden konnten. Da jedoch nur das 2741 bp lange Fragment die zur homologen Rekombination benötigten flankierenden Regionen des *COX13* Gens enthielt, wurden beide gemeinsam in Hefe transformiert. 1 µg der linearisierten DNA wurde in Li-Acetat kompetente Zellen des Hefestammes YPH499 d YPH500 transformiert (Biotechniques, 1992). Bei dem verwendeten Stamm handelt es sich um einen Histidin negativen Wildtyp, der nicht die Fähigkeit hat die Aminosäure Histidin selbst herzustellen. Er wächst demnach nicht auf Selektionsmedien, die kein Histidin enthalten. Da bei der Deletion des *COX13* ORF als auxotropher Marker ein Histidin Gen eingeführt wurde, konnten Zellen, die diese Deletion enthielten, auf Selektionsplatten ohne Histidin wachsen und so nach Histidin Prototrophie selektiert werden. Es handelt sich bei den so isolierten Hefen um diploide, heterozygote Stämme mit einem Wildtyp *COX13* Allel und einem deletierten *d cox13::HIS3* Allel. Eine Trennung der unterschiedlichen Allele kann in Hefe durch Sporulation und anschließende Trennung der haploiden Tetraden erreicht werden. Zunächst wurde die chromosomale DNA der Hefestämme jedoch mit Hilfe von Southern Blot Analysen untersucht, um die Einführung der Deletion nachzuweisen.

### Nachweis der Deletion durch Southern Blot Analyse

Hier sollte die Einführung der Deletion in das Genom der Hefen untersucht werden. Dazu wurde aus mehreren nach der Transformation selektierten Hefestämmen und aus dem Wildtyp YPH499(YPH500 genomische DNA isoliert. Diese DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *EcoR* I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung der DNA erfolgte mit Hilfe radioaktiver Sonden-DNA, einem 1580 bp *BamH* I / *EcoR* I Fragment des Klon pUC18-*COX13*, welches den ORF des *COX13* Gens kodiert, jedoch auch flankierende Bereiche enthielt. Diese Sonde sollte sowohl mit einem 1600 bp Fragment der Wildtyp DNA als auch mit der DNA der Deletionsmutante hybridisieren, wobei durch eine zusätzliche *Pst* I Schnittstelle im *HIS3* Markergen der Deletionsmutante eine Bande mit der Länge 1788 bp und eine zusätzliche bei 1110 bp auftritt. In Abbildung 11 sind die erwarteten Fragmente und die Sonde schematisch dargestellt. Wildtyp YPH499 d YPH500:

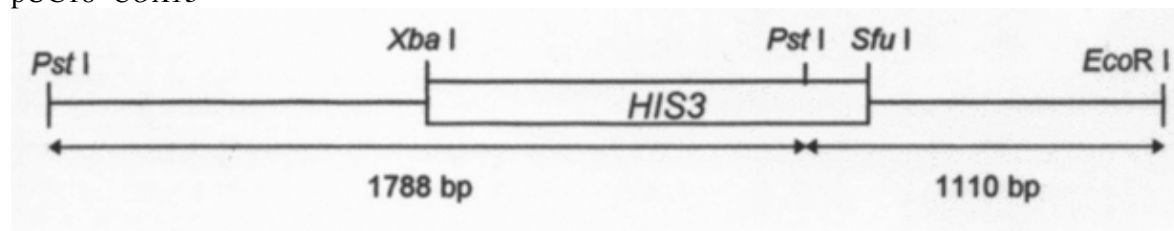


Deletionsmutante: *d cox13::HIS3*:



Sonde:

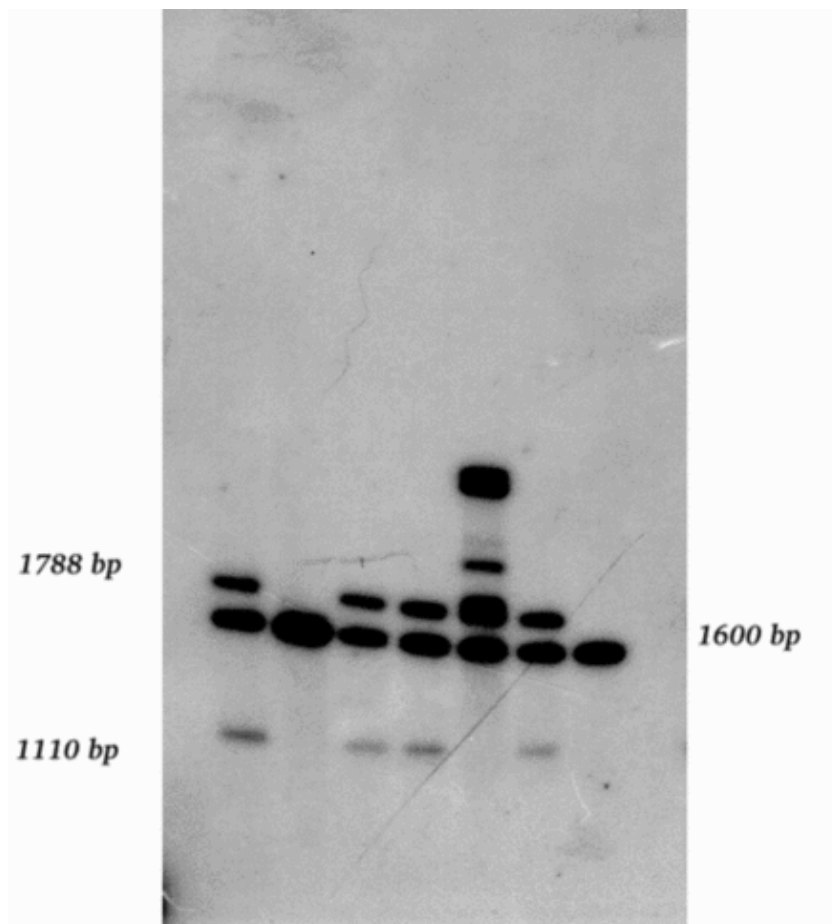
pUC18-*COX13*



**Abb.11: Schematische Darstellung der DNA-Fragmente des Southern Blots und der verwendeten Sonde. Die Größen der beim Southern Blot entstehenden Fragmente sowie die verwendeten Schnittstellen sind angegeben.**

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis des Southern Blots.



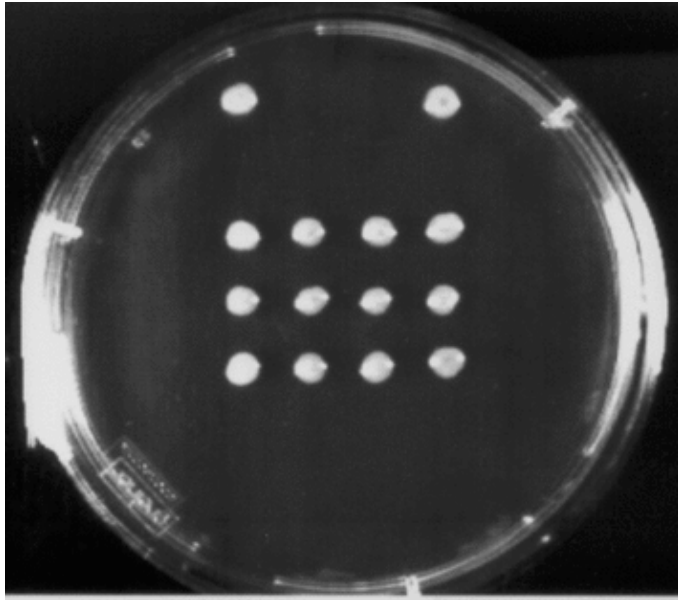


**Abb.12: Autoradiographie der Southern Blot Analyse der transformierten Hefestämme vor der Tetrudentrennung.** Auf das Gel wurden ca. 40 µg verdaute DNA aufgetragen. Als Sonde dienten 100 ng des radioaktiv markierten 1580 bp Fragmentes des *COX13* Gens. Spur 1–6: chromosomale DNA von mit *d cox13::HIS3* transformierten und diploiden Hefestämmen; Spur 7: chromosomale DNA des diploiden Wildtyps. Die Größen der wichtigen Banden sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

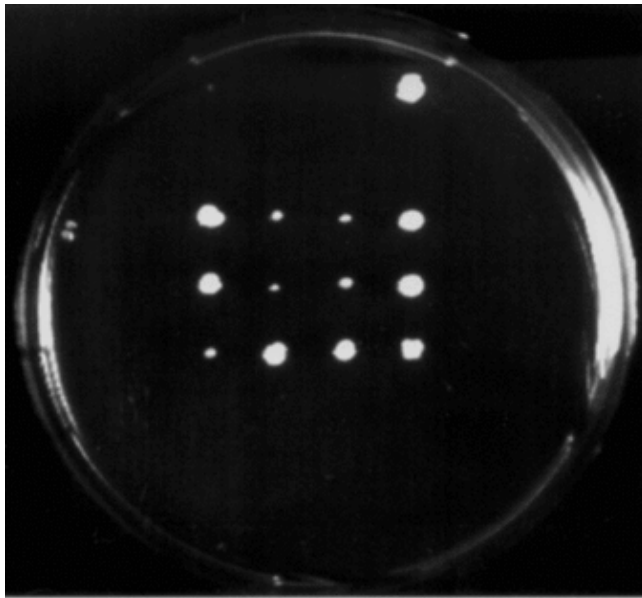
Spur 7 zeigt das 1600 bp Fragment des homozygoten, diploiden Wildtyps. Die Spuren 1, 3, 4 und 6 zeigen das Aufspaltungsmuster eines heterozygoten, diploiden Hefestammes, der sowohl das Allel mit der Deletion als auch das des Wildtyps enthält. Die Bande bei 1600 bp entspricht dem Wildtypallel, während die Banden bei 1788 bp und 1110 bp denen der Deletion entsprechen. Da es sich um die diploiden, heterozygoten Stämme handelt, liegen beide Formen nebeneinander vor. Spur 5 zeigt einen Stamm, dessen DNA nicht vollständig verdaut wurde, und Spur 2 zeigt einen Stamm der nicht transformiert wurde, da er nur die 1600 bp Bande des Wildtyps zeigt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Stämme, deren DNA in den Spuren 1, 3, 4 und 6 aufgetragen war, für die weiteren Schritte eingesetzt.

### **Trennung der *d cox13*- und der Wildtyp-Tetraden**

Zieht man Hefestämme in Stickstoffmangelmedien, so gehen sie Meiose ein und bilden Tetraden, d.h. vier haploide Sporen in einer Hülle, dem Ascus. Aus dem diploiden, heterozygoten Elternstamm entstehen in diesem Fall zwei haploide Sporen des Wildtyps und zwei der Deletion. Zur Induktion der Tetradenbildung inkubierten die Hefestämme drei Tage sowohl in flüssigem Mangelmedium als auch auf Platten. Danach wurde die Bildung der Sporen mikroskopisch kontrolliert. Nach erfolgter Sporenbildung wurde bei einem Teil dieser Zellen die Ascuswand enzymatisch abgedaut, um die Sporen freizusetzen. Die Sporen mehrerer Tetraden wurden nun mit Hilfe eines Singer MSM Mikromanipulators einzeln auf Vollmediumsplatten umgesetzt. Nach etwa einer Woche konnten die aus den Sporen entstandenen haploiden Hefestämme auf Selektionsplatten umgesetzt werden. In diesen Platten war kein Histidin enthalten, so daß ausschließlich die beiden haploiden *d cox13::HIS3* Sporen einer Tetrade wachsen konnten. Abbildung 13 zeigt das Wachstum der Sporen auf Vollmedium– (A) und Selektionsmedium–Platten (B).



**Abb.13 A:** Wachstum der einzelnen Sporen einer Tetrade auf YPD-Vollmedium für 3 Tage bei 30°C. Oben links (an der Position KA) wurde mit Zellen des diploiden Wildtyps angeimpft, oben rechts (an der Position KD) mit Zellen eines heterozygoten Stammes.



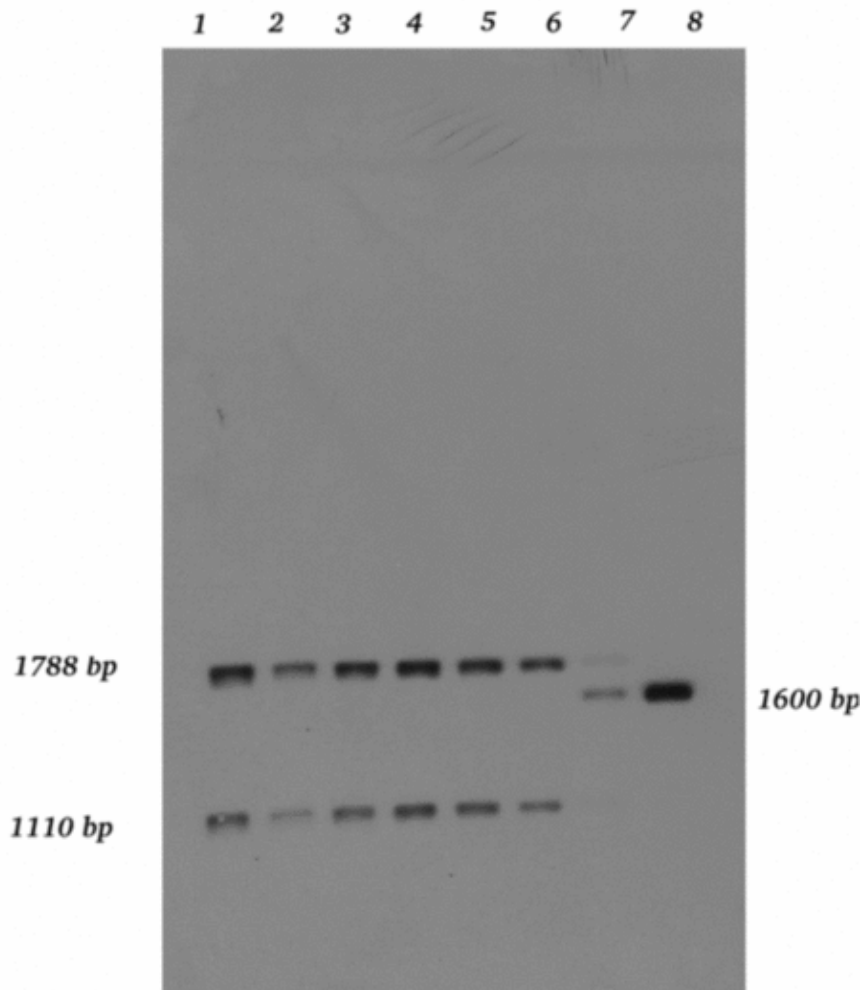
**Abb.13 B:** Wachstum der einzelnen Sporen einer Tetrade auf Selektionsmedium ohne Histidin für 3 Tage bei 30°C. Oben links (an der Position KA) wurde mit Zellen des diploiden Wildtyps angeimpft (keine Kolonie), oben rechts (an der Position KD) mit Zellen eines heterozygoten Stammes.

Zur Wachstumskontrolle wurden die einzelnen Sporen von drei Tetraden auf Vollmedium gezogen. Oben links (an der Position KA) wurde mit Zellen des diploiden Wildtyps angeimpft, oben rechts (an der Position KD) mit Zellen eines heterozygoten Stammes. Anhand dieser Replika-Platten wurden die Stämme der Sporen isoliert, die die Deletion enthielten. Auf der Selektionsplatte ohne Histidin konnten nur die Sporen einer Tetrade wachsen, die die Deletion und damit das *HIS3* Gen enthielten. Es handelte sich hierbei um die Sporen 1A, 1D, 2A, 2D, 3B, 3C und 3D. Bei den oberen Tetraden, in den Reihen 1 und 2 ist eindeutig die 2:2 Aufspaltung der vier Tetraden zu erkennen. Die Ursache für das Auftreten der 3:1 Aufspaltung der Tetraden in Reihe 3 ist unklar. Der Wildtyp zeigte auf den Selektionsplatten kein Wachstum.

### **Nachweis der homozygoten, haploiden Deletionsstämme**

Zum genotypischen Nachweis der homozygoten Deletion wurden Southern Blot Analysen der genomischen DNA durchgeführt. Dazu wurden Kulturen der Stämme gezogen, die auf histidinfreien Medien wachsen

konnten, und so vermutlich die Deletion des *COX13* Gens enthielten. Aus diesen Stämmen wurde genomische DNA isoliert, mit *Pst* I und *EcoR* I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Membran geblottet. Die Hybridisierung der DNA erfolgte mit dem 1580 bp *Bam*HI / *EcoR* I Fragment des Klons pUC18-*COX13*, welches den ORF des *COX13* Gens kodiert, diesmal mit Hilfe eines nicht- radioaktiven Systems der Firma Amersham. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Southern Blot



Analyse.

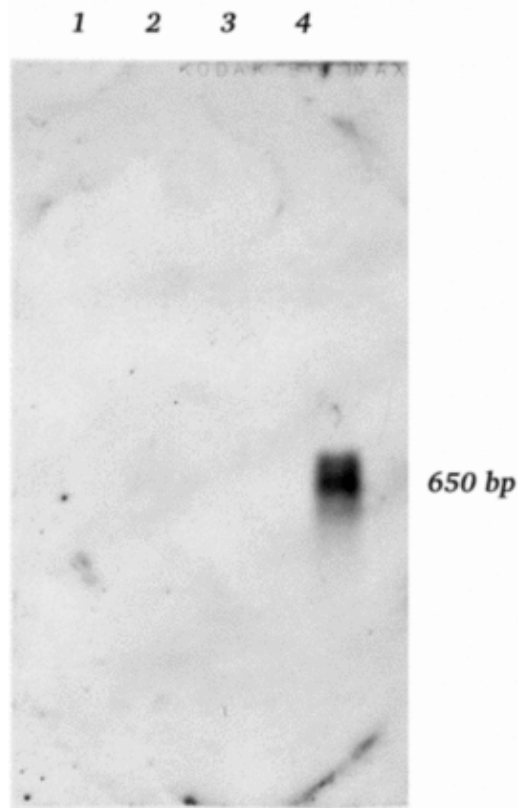
**Abb.14: Ergebnis des Southern Blots mit chromosomaler DNA transformierter Hefestämme nach der Tetradentrennung. Nachweis der homozygoten Deletion des *cox13* Gens in Hefe. Es wurden ca. 40 µg DNA auf das Gel aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit 100 ng eines nichtradioaktiv markierten 1580 bp Fragments des *COX13* Gens. Die Detektion der DNA erfolgte durch Chemilumineszenz. Spur 1-6: DNA der transformierten Zellen; Spur 7: DNA eines heterozygoten Stammes; Spur 8: DNA des Wildtyps.**

Da die Sonde sowohl mit dem ORF des *COX13* Gens als auch mit den flankierenden Regionen hybridisierte, konnten sowohl Wildtyp als auch Deletionsmutante mit einer Sonde detektiert werden. Durch die Einführung einer zusätzlichen *Pst* I Schnittstelle im Histidingen der Deletionsmutante zeigt der Wildtyp nach der Hybridisierung nur ein 1600 bp großes Fragment, während die Deletionsmutante zwei Banden der Größen 1110 bp und 1788 bp zeigt. In Spur 8 des Blots wurde DNA des diploiden, homozygoten Wildtyps zur Kontrolle aufgetragen. Spur 7 zeigt zur Kontrolle die drei Banden eines diploiden, heterozygoten Stammes. Die Spuren 1 bis 6 zeigen Bandenmuster haploider, homozygoter Deletionsmutanten, die durch Tetradentrennung und anschließende Selektion isoliert wurden.

### Nachweis der Deletion auf transkriptionaler Ebene durch Northern Blot

Um die Deletion des *COX13* Gens und damit das Fehlen der COX Untereinheit VIa auf mRNA Ebene zu zeigen, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde aus einem Deletionsstamm und aus Wildtyp die Gesamt-RNA nach einer Methode von Schmitt *et al.* (1990) isoliert. Diese wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. Die Detektion der RNA erfolgte mit Hilfe eines nichtradioaktiven Systems der Firma Amersham. Als Sonde diente ein 477 bp *Sfu* I /

*Xba* I DNA-Fragment aus dem Klon pUC18-*COX13*, in dem die Sequenz des ORF des *COX13* Genes enthalten war. Da dieser Bereich des Gens in der Deletionsmutante entfernt wurde, sollte die Sonde nur mit der mRNA des Wildtyps, nicht jedoch mit der mRNA des Deletionsstammes, eine spezifische Hybridisierung eingehen. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Northern Blot Analyse.



**Abb.15:** Ergebnis des Nachweises der Deletion des *cox13* Gens auf Ebene der RNA. Es wurden ca. 40 µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen. Spur 1: Gesamt-RNA aus Rinderherz; Spur 2: Gesamt-RNA eines später in dieser Arbeit erzeugten Komplementierungsstammes; Spur 3: Gesamt-RNA eines deletierten *d cox13::HIS3* Stammes; Spur 4: Gesamt-RNA des Wildtyps. Die ungefähre Größe der Bande wurde durch lineare Regression anhand der Größe der rRNA-Banden auf dem Gel berechnet.


Spur 4 zeigt die positive Hybridisierung der Sonde mit der mRNA des *COX13* Gens eines Wildtyps, während in Spur 3 keine Hybridisierung mit der RNA des *d cox13::HIS3* Stammes stattfindet. Es wurden demnach Deletionsmutanten des *cox13* Gens erzeugt, deren Phenotyp Cytochrom c Oxidase ohne Untereinheit VIa ist, da nach fehlender Transkription auch keine Translation zum Protein stattfinden kann. Die Spuren 1 und 2 waren für dieses Experiment nicht relevant.

### Nachweis der Deletion auf Proteinebene

Cytochrom c Oxidase aus *S. cerevisiae* wurde nach der Methode von Geier *et al.* (1995) isoliert. Diese Methode basiert auf der Affinitätschromatographie von bc1-Komplex und COX an Hydroxylapatit. Dabei konnte COX des Wildtyps in geringen Ausbeuten nur angereinigt werden. Die Isolation von d VIa-COX aus Deletionsstämmen konnte mit dieser Methode nicht durchgeführt werden, da das Enzym unter verschiedensten Bedingungen nicht mehr an Hydroxylapatit gebunden werden konnte. Aus diesem Grund wurde für die Isolation von d VIa-COX eine Kombination der Methoden von Geier *et al.* und der von Kadenbach *et al.*, (1986) modifizierten Extraktion mit nichtionischen Detergenzien (Jacobs *et al.*, 1966) versucht. In diesem Fall wurde die COX wie bei Geier *et al.* beschrieben aus den Hefemitochondrien extrahiert und ein Großteil des bc1-Komplexes im ersten Chromatographieschritt an Hydroxylapatit abgetrennt. Danach wurde nach Kadenbach *et al.* weiter verfahren und die Lösung der COX mit 3% Cholat versetzt. Anschließend wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei die d VIa-COX jedoch nie als Niederschlag isoliert werden konnte, sondern nur als ölige Lösung. Die Reinheit dieses Enzyms war sehr gering und reichte nicht aus um mit SDS-PAGE das Fehlen der Untereinheit VIa der COX eindeutig zu beweisen. Aus diesem Grund wurde versucht, das Fehlen der Untereinheit VIa mit 2D-Gelelektrophorese

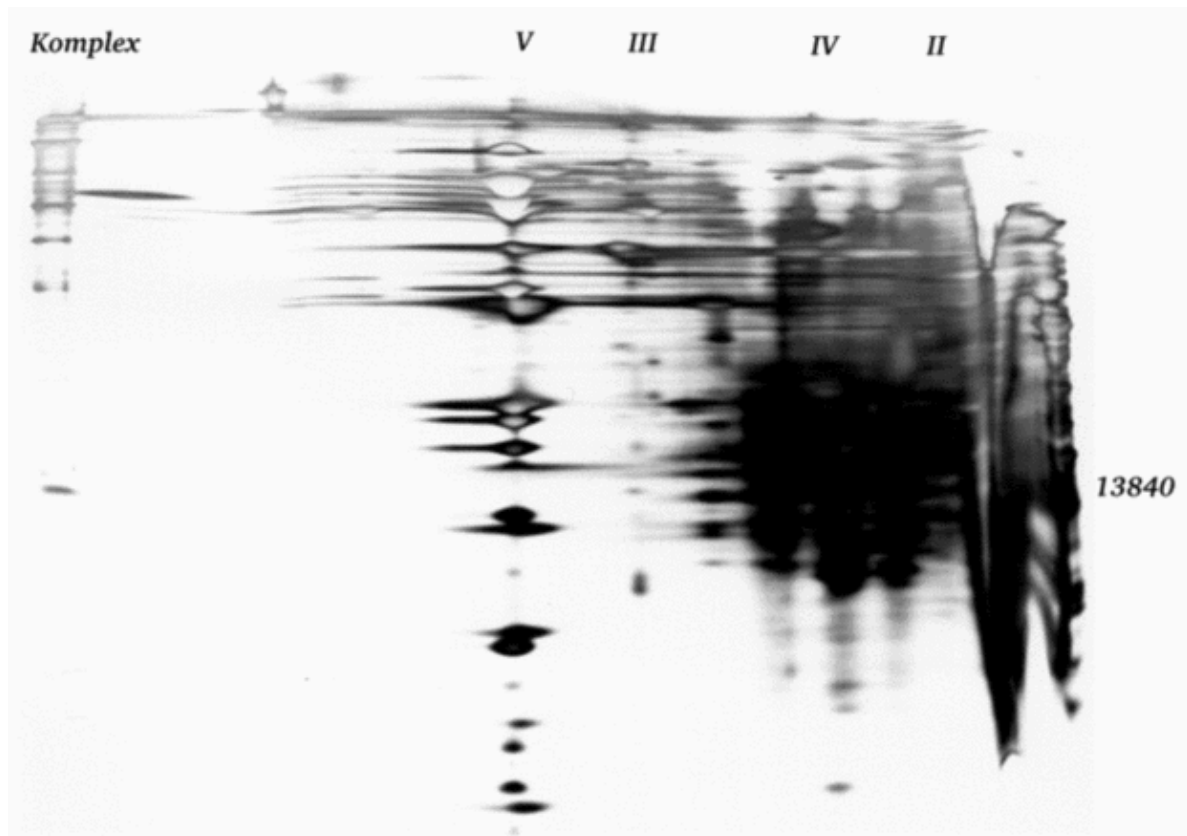
## Zweidimensionale Gelelektrophorese

Komplex V III IV II



13840

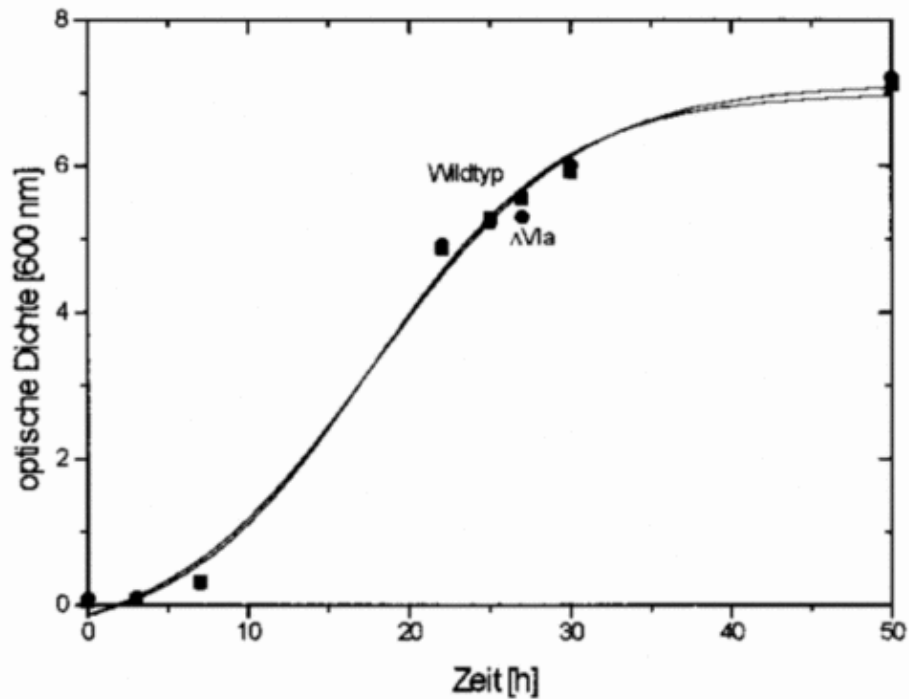
37



**Abb.17:** Trennung der Atmungskettenkomplexe aus Mitochondrien der Deletionsmutante in der zweiten Dimension. In der ersten Dimension wurden die Komplexe mit einem nativen Gel aufgetrennt. Es wurden 200 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Trennung der zweiten Dimension erfolgte mit einem denaturierenden 16.5% T, 3% C Gel in dem 6 M Harnstoff enthalten waren. Die Anfärbung erfolgte mit "Silver Stain".

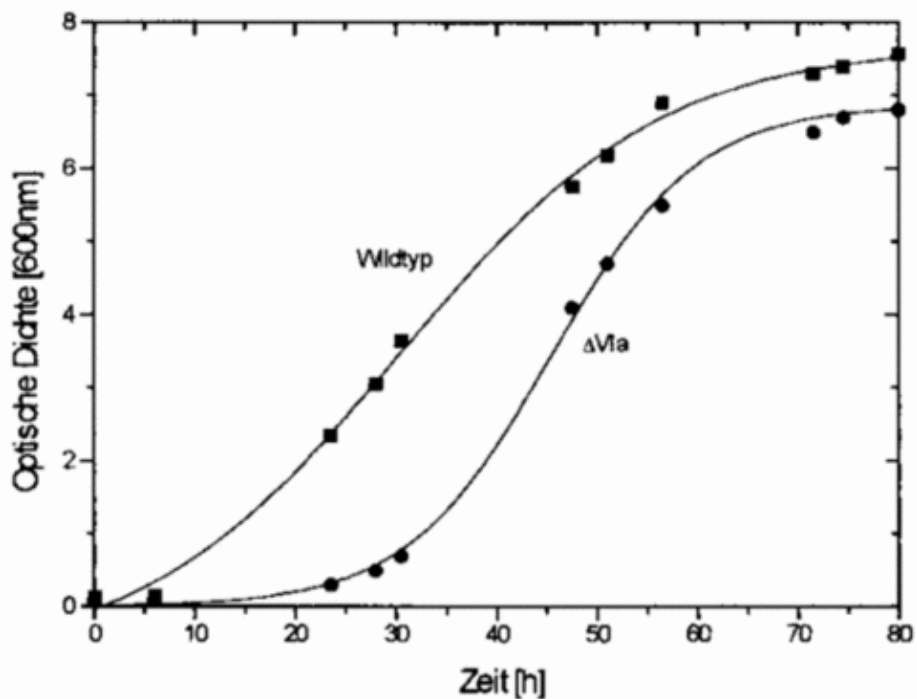
### **Wachstumskontrolle auf nichtfermentierbaren Medien**

Wie auf Agarplatten qualitativ bereits gezeigt (Taanmann *et al.*, 1993), gehört zum Phenotyp der d VIa Deletionsmutanten ein verringertes Wachstum der Zellen auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen. Um dies für die in dieser Arbeit erzeugte Deletionsmutante zu überprüfen, wurden Wachstumskurven in Flüssigmedium mit Lactat als Kohlenstoffquelle aufgenommen. Zur Kontrolle wurden dieselben Stämme auch in glukosehaltigen YPD-Vollmedien angezogen. Figur 1 zeigt das Wachstum der Stämme, bestimmt durch die Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspensionen, gemessen bei 600 nm. Bei allen Stämmen, auch beim Wildtyp, handelt es sich um die haploide Form.



**Fig.1: Wachstumskurven des Wildtyps und der Deletionsmutanten in glukosehaltigem YPD-Medium. Die Zellen wuchsen bei 30°C und 250 rpm. Die Zelldichte wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Quadrate: Wildtyp (n); Kreise: Deletionsmutante d Vla.**

Wie in Figur 1 zu sehen ist, verhält sich das Wachstum der verschiedenen Stämme in Vollmedium gleich, während in nichtfermentierbarem Medium (Fig.2) die Deletionsmutante ein verlangsamtes Wachstum zeigt. In nichtfermentierbarem Medium besitzt der Wildtyp während der frühen exponentiellen Wachstumsphase eine höhere Wachstumsrate als die Deletionsmutante. Die Wachstums-geschwindigkeiten in der exponentiellen Phase sind bei beiden Stämmen annähernd gleich, jedoch tritt die Deletionsmutante später in die exponentielle Wachstumsphase ein. Außerdem erreicht die Deletionsmutante in der stationären Phase nicht die gleiche Zelldichte wie der Wildtyp sondern bleibt etwas darunter.



**Fig.2: Wachstum des Wildtyps und der Deletionsmutante in lactathaltigem nichtfermentierbarem YLac-Medium. Die Zellen wuchsen bei 30°C und 250 rpm. Die Zelldichte wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Quadrate: Wildtyp (n); Kreise: Deletionsmutante d VIa.**

## Komplementierung der Deletion durch Rinder Cytochrom c Oxidase *BHVIa*

Durch die Einführung des Rinderherzgens der Untereinheit VIa mit Hilfe eines Shuttle-Vektors sollte die Deletion der Untereinheit VIa der Hefe komplementiert werden, um ein System für die Zugänglichkeit von Säugetier COX für Mutagenese zu schaffen. Gleichzeitig sollte die Assemblierung des Rinderproteins in Hefe COX untersucht werden.

### Isolation des Cytochrom c Oxidase *BHVIa* Gens

Die Sequenz des Rinderherz COX–*BHVIa* Genes wurde 1991 von Smith et al. aufgeklärt und ist unter BCOX6AH der GenBank™/EMBL Datenbank zu entnehmen. Es handelt sich um ein 344 bp großes Gen, das eine Präsequenz enthält. Die Isolation des Gens erfolgte aus Rinderherz RNA durch Transkription in cDNA. Das Rinderherzgewebe für die RNA-Isolation wurde bereits auf dem Schlachthof in flüssigem Stickstoff eingefroren, um den Abbau der RNA durch RNasen möglichst gering zu halten. Isoliert wurde Gesamt-RNA nach der Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987). Zur Überprüfung der Degradationsgrades der RNA wurde eine denaturierende Agarosegelelektrophorese durchgeführt und außerdem die Menge der isolierten RNA photometrisch bestimmt. Zur Transkription der RNA in cDNA wurde ein degenerierter Poly(T)-Primer eingesetzt, um möglichst vollständige cDNA zu erhalten. Das Gen der BH-Untereinheit VIa konnte mit Hilfe der PCR mit genspezifischen Primern aus dem cDNA-Pool amplifiziert werden. Die Lage der Primer wurde so gewählt, daß durch den Austausch weniger Basen Schnittstellen für die Klonierung eingeführt werden konnten. Der "forward" Primer befand sich an der Position 4–17 bp des Gens und enthielt eine *Hind* III Schnittstelle, während der "reverse" Primer die Position 317–335 bp innehatte und eine *Xba* I Schnittstelle enthielt. Die durchgeführte PCR lieferte ein 330 bp großes Fragment des *BHVIa* Gens. Dieses Fragment wurde mit den Enzymen *Hind* III und *Xba* I verdaut und zur Sequenzierung des *BHVIa* Gens zunächst in den ebenfalls mit *Hind* III und *Xba* I verdauten dephosphorylierten Vektor pBluescript SK<sup>-</sup> kloniert. Beim Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der der Untereinheit VIa von Smith *et al.* (1991) aus der Datenbank fielen zwei Abweichungen in der Nukleotidsequenz auf: G54A und C289T.

1	CCCAGCTTCT	GCCATACATG	GCTTTGCCTC	TGAAGTCCTT
	<u>AAGCTTCT</u>	GCCATACATG	GCTTTGCCTC	TGAAGTCCTT
41	GAGTCGGGGC	TTGGCCAGTG	CGGCCAAGGG	AGACCATGGT
	GAGTCGGGGC	TTGACCAGTG	CGGCCAAGGG	AGACCATGGT
81	GGGACAGGAG	CCCGCACCTG	GCGCTTCCTG	ACTTTCGGGC
	GGGACAGGAG	CCCGCACCTG	GCGCTTCCTG	ACTTTCGGGC
121	TGGCGCTCCC	GAGCGTGGCC	CTCTGCACCC	TCAACTCCTG
	TGGCGCTCCC	GAGCGTGGCC	CTCTGCACCC	TCAACTCCTG
161	GCTCCACTCG	GGCCACCGCG	AGCGCCCGGC	ATTCATCCCT
	GCTCCACTCG	GGCCACCGCG	AGCGCCCGGC	ATTCATCCCT
201	TACCATCACC	TCCGATCCG	CACCAAGCCC	TTCTCATGGG
	TACCATCACC	TCCGATCCG	CACCAAGCCC	TTCTCATGGG
241	GAGACGGCAA	CCACACTTTT	TTCCACAATC	CCCGGGTCAA
	GAGACGGCAA	CCACACTTTT	TTCCACAATC	CCCGGGTCAA
281	CCCTCTGCCC	ACGGGCTACG	AAAAGCCTTG	AGGCTTGGCT
	CCCTCTGCTC	ACGGGCTACG	AAAAGCCTTG	AGGCTTGGCT
321	GATGCCCCC	AGACACAATA	AAAT	
	<u>TGATGCGC AGA</u>			

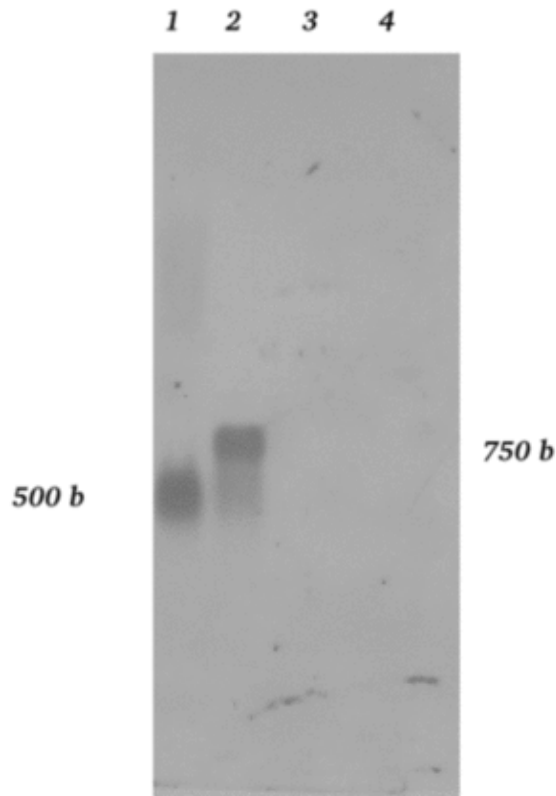


**Abb.18: Nukleotidsequenz der COX Untereinheit VIa aus Rinderherz (Smith *et al.*, 1991, oben) im Vergleich zum Ergebnis der Sequenzierung (zweite Zeile). Die von der Datenbank abweichenden Nukleotide sind fett hervorgehoben und unterstrichen. Die Primer der PCR sind kursiv geschrieben, die Schnittstellen *Hind* III und *Xba* I sind unterstrichen. Die Numerierung der Basen ist von der Literatursequenz übernommen.**

Die Abweichung innerhalb der Sequenz wurde in fünf unabhängigen Klonen überprüft und konnte jedesmal gezeigt werden. Außerdem wurde die PCR zur Kontrolle mit dem "High Fidelity" PCR-Kit der Firma Boehringer wiederholt. Dieser Kit enthält ein Gemisch aus *Taq* und *Pwo* Polymerase, die eine sehr hohe Exonukleaseaktivität besitzen. Auch hier trat die Abweichung auf. Fehler bei der Sequenzierung konnten auch ausgeschlossen werden, da die Gele sehr eindeutig waren. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz bedeutet die Abweichung eine Veränderung von Alanin zu Threonin an Position 1 des maturierten Proteins, und von Prolin zu Leucin an Position 71. Da zumindest das Prolin an Position 71 anhand der Kristallstruktur nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um eine häufiger auftretende Abweichung der Nukleotidsequenz von der Aminosäuresequenz, wie sie auch beim Gen der COX Untereinheit VIa der Hefe gefunden wurde (Taanman and Capaldi, 1993). Nach erfolgreicher Charakterisierung des Gens wurde es zwischen die Schnittstellen *Hind* III und *Xba* I in den Shuttle-Vektor pYPA-XS umklont. Das *BHVla* Gen befindet sich so zwischen dem *PMA1* Promotor und dem *PMA1* Terminator, wodurch die Expression des Gens innerhalb der Hefe gewährleistet wird (Villalba *et al.*, 1992). Außerdem enthält der Shuttle-Vektor ein *LEU2* Markergen, um positive Transformanten durch Leucin Prototrophie selektieren zu können. Die Klonierung und Orientierung des *BHVla* Gens in dem Shuttle-Vektor wurde durch verschiedene Restriktionsverdau und anschließende analytische Agarosegel-elektrophorese überprüft. Der erhaltene Klon heißt pYPA-BHCOXVIa. Eine Karte dieses Plasmides befindet sich im Anhang.

### Komplementierung des *d cox13::HIS3* Genotyps

Mehrere Kolonien der Deletionsmutante wurden als Übernachtskultur herangezogen und mit verschiedenen Mengen Shuttle-Vektor Plasmid-DNA nach der Li-Acetat Methode transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Minimalplatten ohne Histidin und Leucin nach entsprechender Prototrophie. Dabei wurden nur Hefestämme selektiert, die sowohl die *d cox13::HIS3* Deletion als auch das Plasmid mit dem *BHVla* Gen enthielten. Es wurden 25 Transformanten selektiert. Die Expression des *BHVla* Gens in den Hefestämmen wurde durch Northern Blot Analyse nachgewiesen. Dazu wurde von acht der positiven Transformanten, und zur Kontrolle auch von Wildtyp und Deletionsmutante, Übernachtskulturen herangezogen und aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte durch Kapillar-Blotten der Transfer der RNA auf eine Membran. Als Sonde diente ein 330 bp Fragment des *BHVla* Gens aus dem Klon pBlue-BHVla. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung.

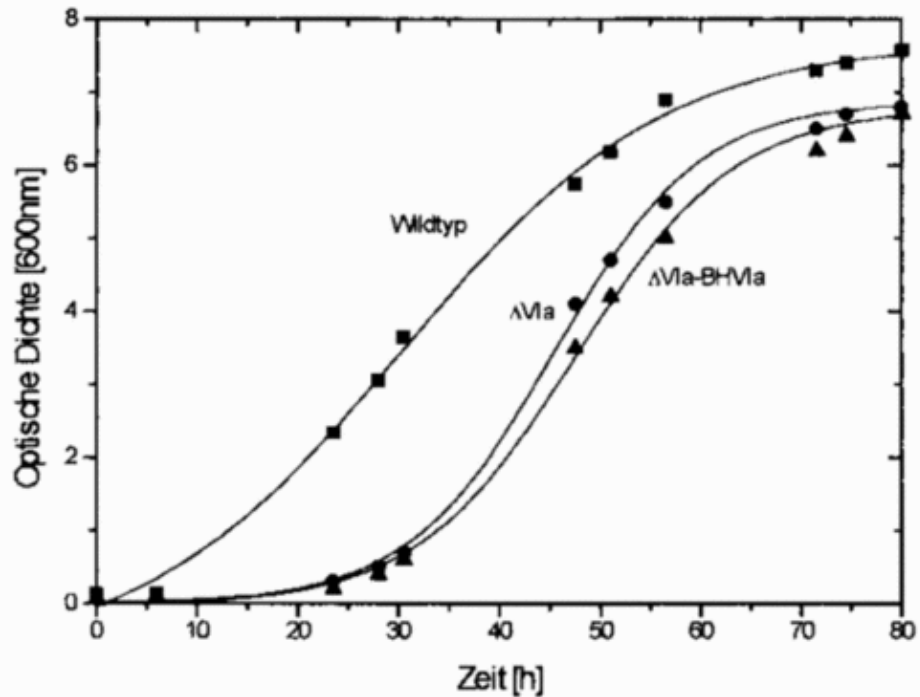


**Abb.19: Ergebnis des Northern Blots zur Komplementierung.** Es wurde ein nichtradioaktives System der Firma Amersham eingesetzt. Pro Spur wurden 40 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Spur 1: Gesamt-RNA aus Rinderherz; Spur 2: Gesamt-RNA eines Komplementierungsstammes; Spur 3: Gesamt-RNA der Deletionsmutante; Spur 4: Gesamt-RNA des Wildtyps. Die relativen Größen der Banden wurden durch lineare Regression bestimmt und sind in Basen (b) angegeben.

In Spur 4 findet keine Hybridisierung statt, da hier RNA des Wildtyps zur Kontrolle aufgetragen wurde. Ebenso zeigt Spur 3 keine Hybridisierung zwischen der RNA der Deletionsmutante und dem *BHVIa* Gen. In Spur 2 findet die Hybridisierung des *BHVIa* Gens mit der RNA der komplementierten Transformante statt. Spur 1 zeigt zur positiven Kontrolle die Hybridisierung zwischen dem *BHVIa* Gen und Rinderherz Gesamt-RNA. Durch diesen Northern Blot konnte die Expression des *BHVIa* Gens in den Hefestämmen eindeutig nachgewiesen werden. Die Ursache für das Auftreten der zwei Banden in Spur 2 konnte nicht geklärt werden.

### Untersuchung des Phenotyps der Komplementierung

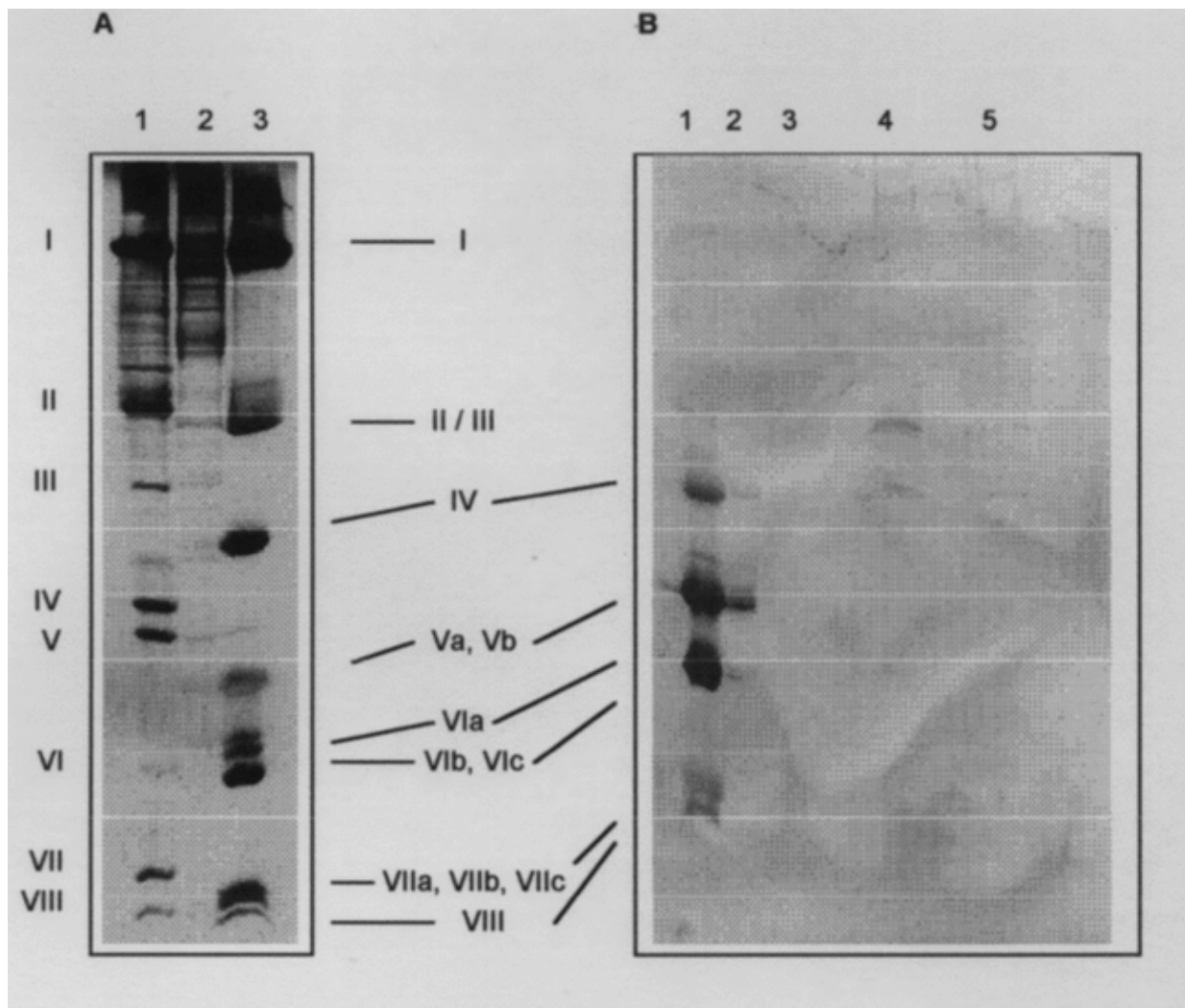
Zunächst wurde das Wachstum der Komplementierungsstämme kontrolliert. Da die Deletionsmutante wie bereits beschrieben in nichtfermentierbaren Medien ein reduziertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp zeigt, sollte überprüft werden, ob diese Reduktion durch die Komplementierung der Untereinheit VIa beeinflusst werden konnte. Dazu wurden Wachstumskurven von Wildtyp, Deletionsmutante und Komplementierungsmutante aufgenommen und verglichen. Figur 3 zeigt den graphischen Vergleich der drei



Stämme.

**Fig.3: Vergleich des Wachstums von Wildtyp, Deletionsmutante (Vla) und Komplementierungsstamm (Vla-BH-Vla) in lactathaltigem nichtfermentierbarem YLac-Medium. Die Zellen wuchsen bei 30°C und 250 rpm. Die Zelldichte wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Quadrate: Wildtyp (n); Kreise: Deletionsmutante (Vla; Dreiecke: Komplementierungsstamm.**

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Komplementierungsmutante in der frühen exponentiellen Wachstumsphase zeigt eine weitere leichte Reduktion des Wachstums im Vergleich zur Deletionsmutante. Demnach scheint das Plasmid des Shuttle-Vektors das Wachstum der Hefen eher negativ zu beeinflussen. Im Vergleich zum Wildtyp treten beide Stämme später in die exponentielle Wachstumsphase ein. Während dieser Phase zeigen sie jedoch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als der Wildtyp. Die mutierten Stämme erreichen in der stationären Phase nicht die Zelldichte des Wildtyps. Der Nachweis der Untereinheit Vla des Rinderherzenzyms in Hefe-mitochondrien sollte durch Western Blot Analyse erfolgen. Da die Hefestämme nicht sehr viel COX enthielten, mußte zunächst überprüft werden bis zu welcher minimalen COX Konzentration noch eine Reaktion mit den verwendeten Antikörpern im Western Blot zu erkennen war. Dies war bei Rinderherzmitochondrien bis zu 2 µg COX der Fall, darunter war keine Detektion mehr möglich. Verwendet wurden sowohl die polyklonalen Antikörper BH-Holo13.3.90 und BH-Holo II,14.3.90 gegen Rinderherz COX als auch der monoklonale Antikörper 378 gegen die Rinderherz COX Untereinheiten Vla und VIc (Schneyder, 1990). Da auf die Gele nicht unbegrenzte Mengen Protein aufgetragen werden konnten, mußte das COX / Protein Verhältnis verbessert werden. Dazu wurden Hefemitochondrien mit Ultraschall beschallt und anschließend fraktioniert zentrifugiert. Die COX befand sich danach im Pellet, das direkt in Probenpuffer aufgenommen wurde. Der Überstand wurde photometrisch auf die Abwesenheit von COX überprüft und anschließend die enthaltenen Proteine mit TCA gefällt. Dieser Niederschlag wurde ebenfalls in Probenpuffer aufgenommen und als Negativkontrolle auf das Gel aufgetragen. Das Gel blottete man nach beendeter SDS-PAGE auf eine Membran, auf der die Proteine detektiert wurden. Als Positivkontrolle dienten COX aus Rinderherz und Rinderherzmitochondrien. Für den Fall, daß die Untereinheit Vla im heterologen Enzym in substöchiometrischen Mengen vorliegt, wurde ein Vielfaches der minimal erforderlichen 2 µg COX aufgetragen. Da die Gele, um dies zu erreichen, mit Gesamtprotein überladen werden mußten, wurde auf eine Abbildung verzichtet. Zur Veranschaulichung wurden Hefe COX, Rinderherzmitochondrien und Rinderherz COX mit einem Kadenbach-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Abbildung 20 zeigt ein solches Gel. Die 11 Untereinheiten der Hefe COX konnten mit diesem Gelsystem nicht aufgetrennt werden.



**Abb.20 A:** Coomassie Anfärbung eines Kadenbach-Gels. Spur 1: 40 µg angereinigte Hefe COX; Spur 2: Rinderherzmitochondrien mit ca. 5 µg COX; Spur 3: 40 µg Rinderherz COX. Die Namen der Untereinheiten sind angegeben. **Abb.20 B:** Ergebnis des Western Blots zur Komplementierung von Hefe COX mit der Rinderherz Untereinheit VIa. Die Proteine wurden zunächst auf einem Kadenbach-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. In Spur 1 wurden 40 µg Rinderherz COX aufgetragen. In Spur 2 wurden Rinderherzmitochondrien aufgetragen in denen 5 µg COX enthalten waren. In Spur 3 wurden 40 µg Hefe COX aufgetragen. Spur 4 enthielt das Pellet der beschallten Mitochondrien eines Komplementierungsstammes mit ca. 10 µg COX. Spur 5 enthielt die aus dem COX-freien Überstand mit TCA gefällten Proteine. Die Immunofärbung erfolgte mit einem Gemisch der polyklonalen Antikörper gegen das Holoenzym (BH-Holo + BH-Holo II).

Der Western Blot zeigt in Spur 1 die positive Reaktion der polyklonalen Antikörper mit den Untereinheiten IV, Va, Vb, VIa, VIc, VIIa, b, c und VIII der Rinderherz COX. Spur 2 zeigt die Reaktion der Antikörper mit COX in Rinderherzmitochondrien. Die Untereinheiten Va und Vb zeigen eine deutliche Reaktion, während die Untereinheiten VIa und VIc schwach zu erkennen sind. Die Mitochondrien des komplementierten Hefestammes zeigen keine Reaktion mit den polyklonalen Rinderherz Antikörpern (Spuren 4 und 5). Kreuzreaktivität zwischen den Untereinheiten VIa aus Hefe und Rinderherz wurde zuvor ausgeschlossen. In Abbildung 23 wurden Fraktionen dieser Mitochondrien auch in Western Blots mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Rinderherz Untereinheit VIa untersucht. Auch dort konnte die Rinderuntereinheit VIa nicht in den Hefemitochondrien nachgewiesen werden.

## Komplementierung mit Hilfe des Hefeprecursors

Um den Import des Rindergens in die Hefemitochondrien zu erleichtern, wurde die Komplementierung mit einem Genkonstrukt wiederholt. Dabei handelt es sich um ein Konstrukt aus Rinderherzgen und Hefeprecursor.

5'-agctt atg ttt aga cag tgt gct aag aga taT GCC AGT GCG GCC-3'  
a tca aaa tct gtc aca cga ttc tct atA CGG T

**Abb.21: Nukleotidsequenz des Konstruktes aus Hefeprecursor des *COX13* Gens und dem Rinderherz Gen *BHV1a*. Die Hefesequenz ist kursiv geschrieben, die Rindersequenz und der überlappende Bereich in fetten Großbuchstaben. Die Sequenz der *Bgl* I Schnittstelle (5'-GCCNNNNNGGC-3') ist unterstrichen. Met bezeichnet den Start des Hefeprecursors. +1 markiert das Leseraster und die Position der ersten Aminosäure des maturierten Rinderproteins.**

Der Übergang zwischen Hefeprecursor und maturiertem Rinderherzprotein sollte an einer *Bgl* I Schnittstelle stattfinden, die sich über die Nukleotidsequenz der ersten Aminosäure des maturierten Rinderproteins erstreckt. Da diese Schnittstelle durch die von der Datenbank abweichende DNA-Sequenz fehlte, mußte sie durch gezielte Mutagenese mit PCR wieder hergestellt werden. Der verwendete "forward" Primer Hefe\_6aBgl1 enthielt dazu die erwünschte Mutation an Position acht. Zur PCR wurde die zuvor erzeugte cDNA aus Rinderherz eingesetzt. Durch die Verwendung einer Polymerase mit hoher Exonukleaseaktivität mußten die ersten fünf Zyklen der PCR mit Klenow Polymerase durchgeführt werden um den Einbau der Mutation zu gewährleisten. Anschließend wurde das *Taq/Pwo*-Gemisch zugegeben und das 350 bp Fragment mit der Mutation amplifiziert. Der Hefeprecursor bestand aus dem Hybridisierungsprodukt zweier synthetischer Oligonukleotide und enthielt den kompatiblen Teil der *Bgl* I Schnittstelle. Die beiden Fragmente wurden nach dem *Bgl* I Verdau des PCR-Fragmentes hintereinander ligiert. Dieses Konstrukt konnte nach einem *Hind* III und *Xba* I Verdau in entsprechend vorbereiteten pBluescript SK<sup>-</sup> Vektor kloniert werden. Verdaue mit verschiedenen Restriktionsenzymen, insbesondere *Bgl* I bewiesen die Richtigkeit des Klonen, der daraufhin sequenziert wurde. Die erhaltene Sequenz enthielt die oben angegebenen Übergänge zwischen Hefe- und Rindergen und daran anschließend, das gesamte Gen der Untereinheit *BHV1a*. Das Konstrukt wurde in den Shuttle-Vektor pYPA-XS umklont und erneut durch Restriktionsverdaue charakterisiert. Dieses Konstrukt heißt im folgenden pYPA-y*Prec*-*BHV1a*. Nach der Transformation der Deletionsmutanten mit diesem Plasmid wurde erneut nach Histidin und Leucin Prototrophie selektiert. Von 10 der Transformanten wurden Übernachtskulturen herangezogen, um aus den Zellen Gesamt-RNA für die Northern Blot Analyse zu isolieren. Der Northern Blot wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle diente Gesamt-RNA des Wildtyps und als Positivkontrolle Gesamt-RNA eines Stammes, der bei der ersten Komplementierung ein positives Signal lieferte. Sonde war wieder das Fragment des *BHV1a* Gens. Der Northern Blot zeigt, daß alle Transformanten mit dem *BHV1a* Gen hybridisieren und demnach das Genkonstrukt exprimieren.

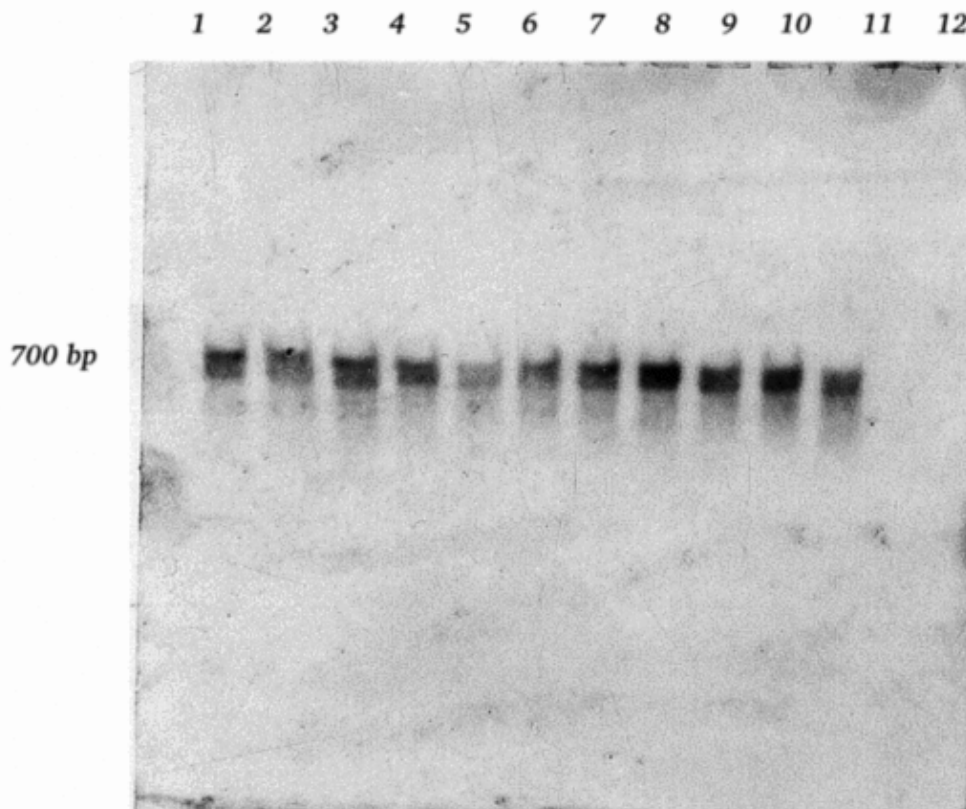


Abb.22: Ergebnis des Northern Blots der mit dem Konstrukt aus Hefeprecursor und *BHVla* Gen komplementierten Hefestämme. Es wurden jeweils 40 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Spur 1–10: Gesamt-RNA der mit dem Konstrukt transformierten Stämme; Spur 11: Gesamt-RNA eines ohne Hefeprecursor komplementierten Stammes als Positivkontrolle; Spur 12: Gesamt-RNA des Wildtyps als Negativkontrolle. Die ungefähre Größe der Banden wurde durch lineare Regression ermittelt.

## Nachweis des BHVla-Proteins in Hefe

Auch bei dieser Komplementierung wurde zuerst das Wachstum der verschiedenen Stämme verglichen. Auch hier ist durch die Einführung des Rindergens keine Veränderung des Wachstums festzustellen, sowohl Deletionsmutante als auch Komplementierungsmutante besitzen gleiche Wachstumsgeschwindigkeiten.

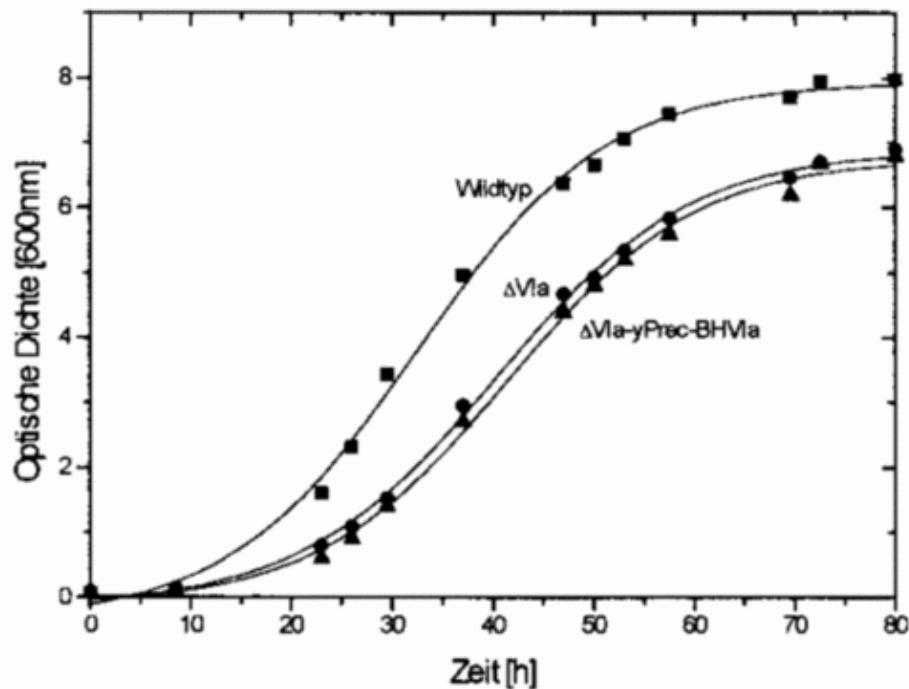
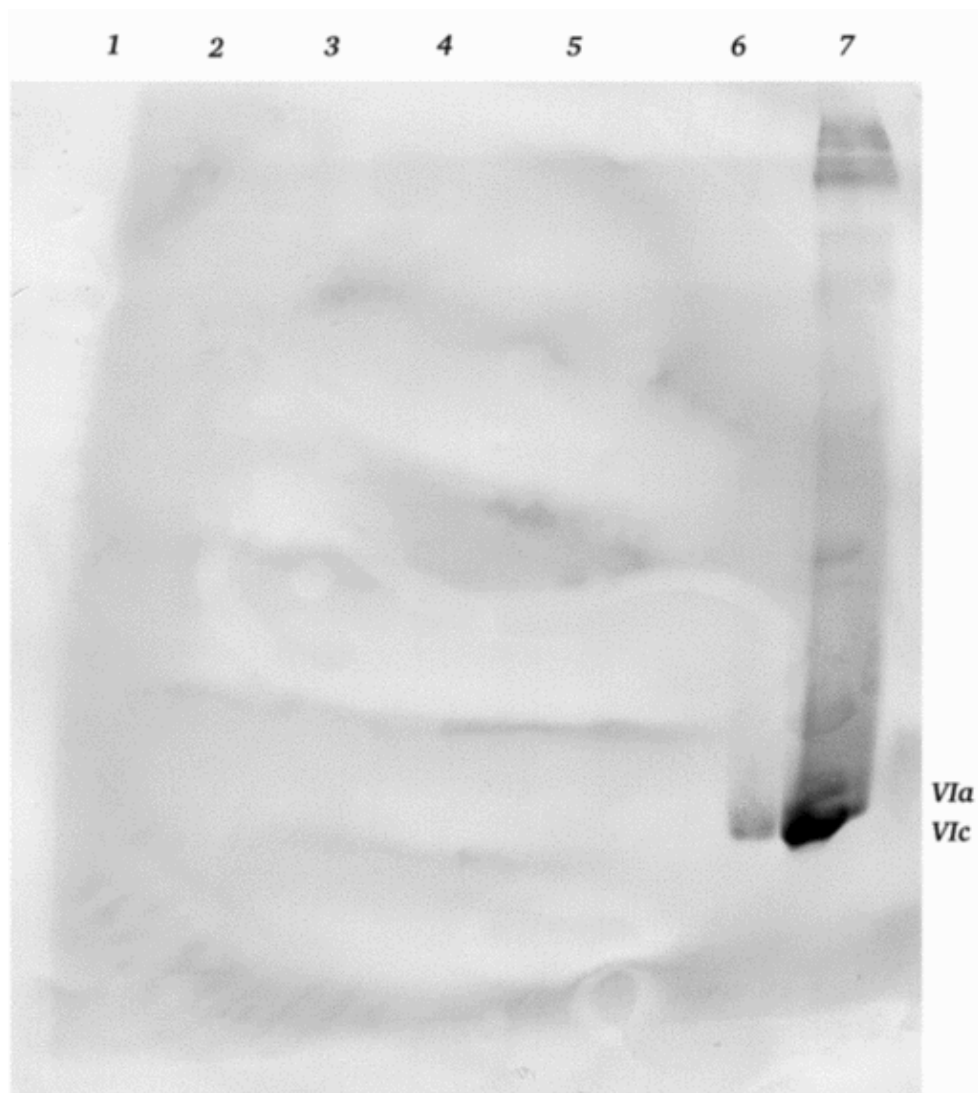


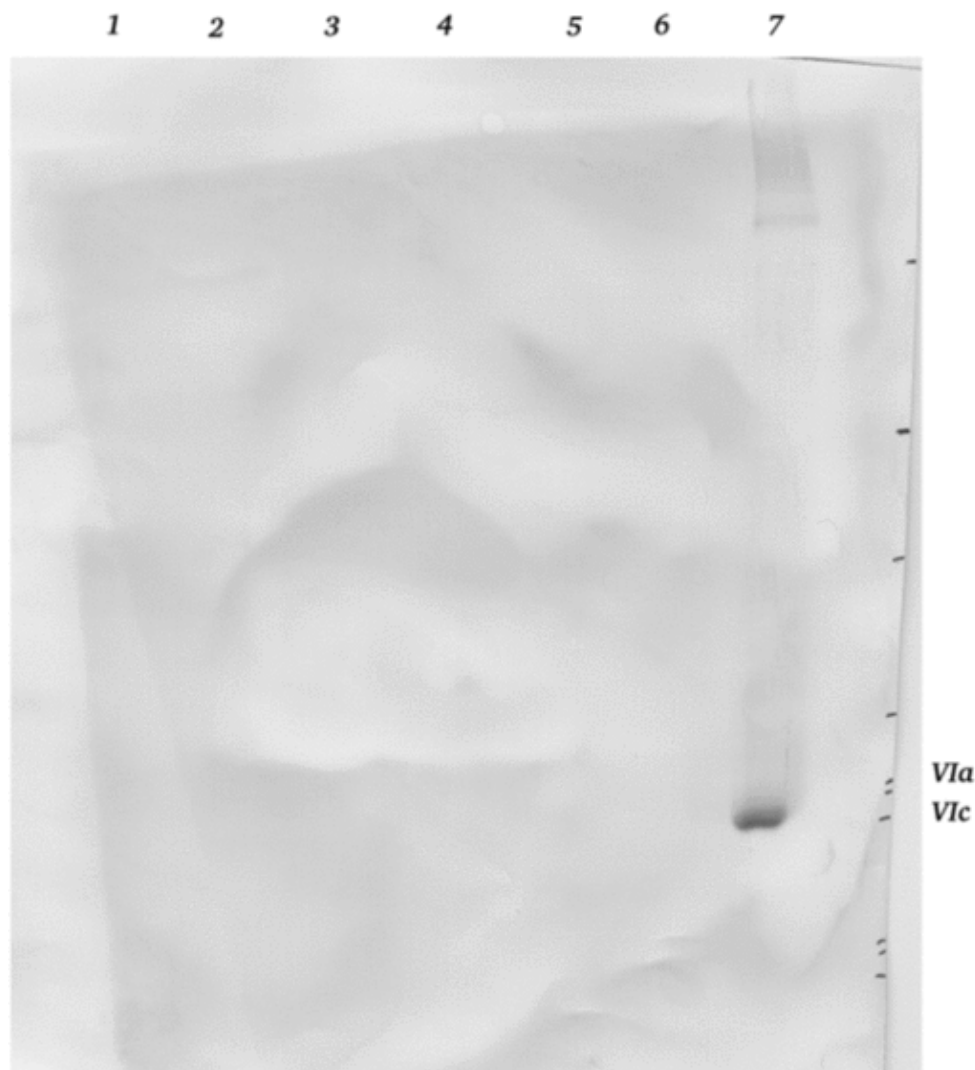
Fig.4: Vergleich des Wachstums von Wildtyp, Deletionsmutante und Komplementierungsstamm d *Vla-yPrec-BHVla* in nichtfermentierbarem YLac-Medium. Die Zellen wuchsen bei 30°C und 250 rpm. Die Zelldichte wurde durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Quadrate: Wildtyp (n); Kreise: Deletionsmutante d *Vla*; Dreiecke: Komplementierung d *Vla-yPrec-BHVla*.

Durch Western Blot Analysen sollte das Rinderherzprotein der COX Untereinheit *Vla* in den *yPrec-BHVla* Komplementierungsstämmen lokalisiert werden. Gleichzeitig wurden Mitochondrien der ohne Hefeprecursor komplementierten *BHVla*-Stämme eingesetzt, um diese ebenfalls mit dem monoklonalen Antikörper zu untersuchen. Mitochondrien beider Stämme wurden beschallt und durch Zentrifugation fraktioniert. Das COX-haltige Pellet wurde direkt in Probenpuffer aufgenommen, während die Proteine aus dem Überstand erst mit TCA gefällt werden mußten. Zur Kontrolle wurden Rinderherz COX (Spur 7), Hefe COX (Spur 5) und Rinderherzmitochondrien (Spur 6) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE, gefolgt vom Blotten der Proteine auf eine Membran. Die Detektion wurde mit dem monoklonalen Antikörper 378 durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, daß bei beiden Stämmen weder im Cytosol (Überstand, Spuren 1 und 3) noch in der Innenmembran (Pellet, Spuren 2 und 4) der Mitochondrien das Protein der Rinderherz COX Untereinheit *Vla* zu finden ist. In diesen Spuren findet keine Reaktion des Antikörpers mit einem Protein statt.



**Abb.23:** Ergebnis des Western Blots mit dem monoklonalen Antikörper 378. Die Proteine wurden zunächst auf einem Kadenbach-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. In Spur 1 wurden ca. 10 µg COX der Membranfraktion des d Vla-BHVla-Stammes aufgetragen. In Spur 2 wurde der COX freie Überstand der Fraktionierung aufgetragen. In Spur 3 wurden ca. 10 µg COX der Membranfraktion des d Vla-γPrec-BHVla-Stammes aufgetragen. In Spur 4 wurde der COX freie Überstand der Fraktionierung aufgetragen. In Spur 5 wurden 40 µg Hefe COX aufgetragen. Spur 6 zeigt Rinderherzmitochondrien in denen 5 µg COX enthalten waren. Spur 7 enthielt 40 µg Rinderherz COX.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß auch mit dem vorgeschalteten Hefeprecursor das Rinderprotein nicht in die Membran der Hefemitochondrien importiert wurde. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob der Import des Proteins, die Assemblierung oder bereits die Translation der cDNA gehemmt ist. Nach erfolgter Translation müßte das Protein innerhalb der Zellen nachweisbar sein. Um dies zu prüfen, wurden ganze Hefezellen beider komplementierten Stämme beschallt und die Zelltrümmer durch kurze Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit entfernt. Anschließend wurde wie bereits beschrieben zentrifugiert und das Membranpellet in Probenpuffer aufgenommen. Durch eine TCA-Fällung wurden die löslichen Proteine aus dem Überstand isoliert. Die Trennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE. Anschließend wurden sie auf eine Membran geblottet und dort mit dem Antikörper 378 gegen Rinderherz COX Untereinheit VIa detektiert. Keine der Fraktionen des Gesamt-Hefeproteins zeigt eine Reaktion mit dem Antikörper. Innerhalb der Hefezellen ist keine COX Untereinheit VIa des Rindes nachzuweisen.



**Abb.24:** Ergebnis des Western Blots mit dem monoklonalen Antikörper 378. Spur 1: ca. 10 µg COX in der Membranfraktion der Zellen des d Vla-BHVIa-Stammes; Spur 2: Proteine der löslichen Fraktion der Zellen des (Vla-BHVIa-Stammes; Spur 3: ca. 10 µg COX in der Membranfraktion der Zellen des (Vla-yPrec-BHVIa-Stammes; Spur 4: Proteine der löslichen Fraktion der Zellen des d Vla-yPrec-BHVIa-Stammes; Spur 5: 40 µg Hefe COX; Spur 6: ca. 5 µg COX in Rinderherzmitochondrien; Spur 7: 40 µg Rinderherz COX.

Die Spuren 1 und 2 enthielten die Membranfraktion und die lösliche Fraktion aller Proteine von Zellen des d Vla-BHVIa-Stammes. Die Spuren 3 und 4 enthielten die gleichen Fraktionen des d Vla-yPrec-BHVIa-Stammes. Keine davon zeigt eine positive Reaktion mit dem BHVIa Antikörper, dieses Protein ist demnach nicht in den Hefezellen enthalten. Die Spuren 6 und 7 zeigen die positive Kontrollreaktion des Antikörpers mit Rinderherz COX. Alle Western Blots wurden analog auch mit einem 1:1 Gemisch der polyklonalen Antikörper durchgeführt. Auch mit diesen Antikörpern konnte die Rinderherz Untereinheit Vla nicht in Hefe nachgewiesen werden.

## Kinetische Kontrolle der Komplementierung

Aktivitätsmessungen an solubilisierten Mitochondrien der verschiedenen Komplementierungsmutanten sollten für heterologe Enzyme Unterschiede zu den Aktivitäten des Wildtyps und insbesondere der Deletionsmutante aufweisen. Diese Messungen wurden durchgeführt, um die Ergebnisse der Western Blots zu bestätigen, und so eine zu geringe Sensitivität der Antikörper auszuschließen. Figur 5 zeigt das Ergebnis der Messungen. Da sich die Aktivitäten der COX der beiden komplementierten Stämme im Rahmen der Messungenauigkeit nicht von der der Deletionsmutante unterscheiden, handelt es sich nach wie vor um deletierte COX und nicht um heterologe, komplementierte Hefe COX die eine Untereinheit des Rinderenzym enthält.



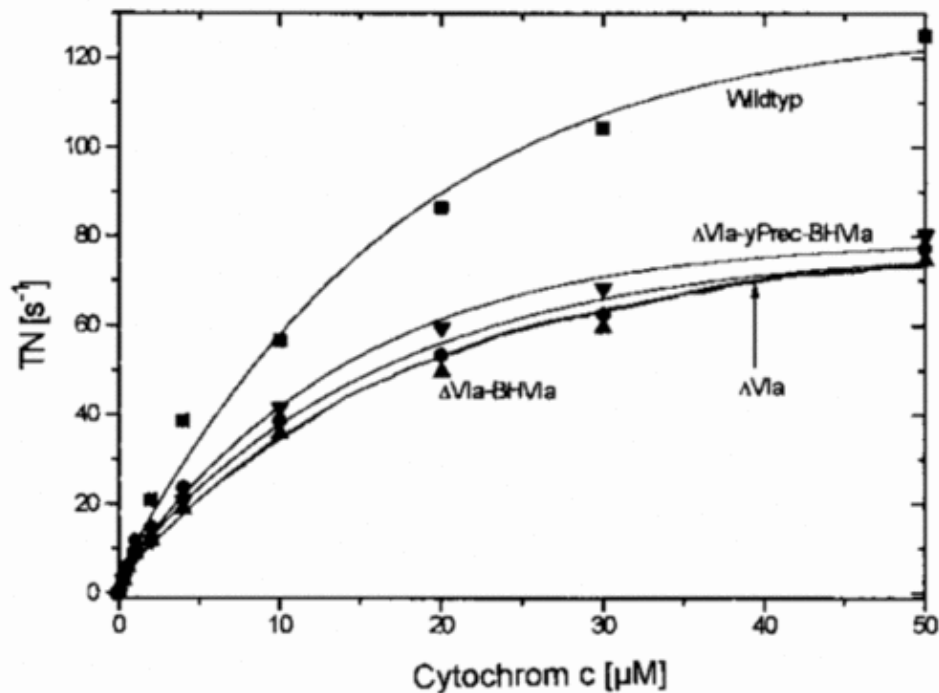


Fig.5: Messung der Ascorbatatmung von 10 nM COX in Tween-80 solubilisierten Mitochondrien verschiedener Hefestämme in Abhängigkeit der Cytochrom c Konzentration. Die Titration erfolgte mit Hefe Cytochrom c. Quadrate: Wildtyp; Kreise: Deletionsmutante d Vla; Basisdreiecke: Komplementierungsmutante ohne Hefeprecursor d Vla-BHVa; Spitzdreiecke: Komplementierung mit Hefeprecursor d Vla-yPrec-BHVa. Die Messungsgenauigkeit betrug 7 TN s<sup>-1</sup>.

### Isolation des Precursors der Rinderleber Untereinheit Vla

Die cDNAs der Gene von COX besitzen häufig eine Präsequenz, wie bei der Rinderherz Isoform der Untereinheit Vla bereits gezeigt wurde (Smith *et al.*, 1991). Für die Leberisoform der COX Untereinheit Vla der Ratte konnte eine Präsequenz nachgewiesen werden (Mell *et al.*, 1994). Auch für die menschliche COX Untereinheit Vla-L ist die Präsequenz bekannt (Fabrizi *et al.*, 1989, 1992), während dies beim Rinderlebergen nicht der Fall ist (Ewart *et al.*, 1991). Berechnungen von Strukturelementen bei Rattenleber mRNA haben für den 5'-Bereich energiearme Sekundärstrukturen ergeben (Exner, 1997). Diese erschweren die Transkription der mRNA in cDNA, weshalb für einige Lebergene bis jetzt noch keine Präsequenzen gefunden werden konnten. Da im Rahmen dieser Arbeit die Techniken der RT-Reaktion und der PCR bereits angewandt wurden, sollte nach einer möglichen Präsequenz des Rinderlebergens der Untereinheit Vla der COX gesucht werden. Gesamt-RNA aus Leber wurde nach der Guanidiniumthiocyanat Methode isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Reaktion der Reversen Transkriptase erfolgte mit genspezifischen Primern und zusätzlichen Denaturierungsschritten, um die Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen und so längere cDNA Fragmente zu erhalten. Diese cDNA Fragmente wurden anschließend polyadenyliert. Das angefügte Poly(A)-Ende wurde zur Erzeugung des cDNA-Zweitstranges durch einen Poly(T)-Primer genutzt. Die cDNA diente als Template für eine erste Touch Down PCR mit genspezifischen Primer im 3'-Bereich des BLVla Gens. Eine weitere PCR mit inneren Primern erhöhte die Spezifität der Amplifikation, es konnte jedoch keine stringente Bande amplifiziert werden. Da die genaue Größe des Gens nur auf 350-360 bp abgeschätzt werden konnte, wurde der gesamte PCR-Ansatz für die Klonierung phosphoryliert. Die Klonierung erfolgte in Sma I verdauten dephosphorylierten pBluescript SK<sup>-</sup> Vektor. 108 der durch blau/weiß Screens isolierten Klone wurden durch Restriktionsverdau genauer untersucht, wovon etwa die Hälfte ein Insert enthielten. Die Größe dieser Inserts lag zwischen 100 und 400 bp. Die Klone mit den längsten Inserts wurden sequenziert. Alle sequenzierten Klone begannen im 5'-Bereich mit der Sequenz des maturierten Proteins, wie von Ewart *et al.* angegeben, die meisten waren sogar kürzer.

+1  
1 TCGAGTGGCG CCCACGGAGA AGAGGGCTCA GCTCGCATGT GGAAGGCCCT  
51 CACCTTATTC GTGGCGCTCC CTGGGGTGGG AGTGAGCATG CTGAATGTCT  
101 TCATGAAGTC GCACCACGGA GAGGAGGAGA GACCCGAGTT CGTGGCCTAT

```

151      CCCCATCTCC GCATCAGGTC CAAGCCCTTT CCCTGGGGAG ATGGTAACCA
201      TA      CCCTATTC CATAACCCTC ATGTGAACCC GCTTCCAACC GGCTATGAAG
                GSP2                GSP1                GSP-RT
251      ATGAGTAA

```

**Abb.25: Nukleotidsequenz des COX *BL VIa* Gens. Die Positionen der Basen sind vor der Sequenz angegeben. +1 bezeichnet das Kodon der ersten Aminosäure des maturierten Proteins. Unterstrichen und kursiv sind die Positionen der genspezifischen 5'-RACE Primer angegeben.**

Da bei immer mehr Organismen Präsequenzen der Untereinheiten VIa isoliert werden konnten (Hüttemann *et al.*, 1997), besitzt mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Rinderleber Untereinheit VIa eine Präsequenz, die unter den hier angewandten Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

## Kinetische Untersuchungen an *S. cerevisiae* Cytochrom c Oxidase

Taanman und Capaldi haben bereits kinetische Untersuchungen an COX aus *S. cerevisiae* durchgeführt (Taanman *et al.*, 1993, 1994). Jedoch wurden ihre Messungen spektroskopisch und in Dodecylmaltosid durchgeführt. Wie bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, hat Dodecylmaltosid einen großen Einfluß auf die COX. Mit diesem Detergenz ist es möglich die Untereinheit VIb des Rinderenzym selektiv abzutrennen (Weishaupt and Kadenbach, 1992). Außerdem ist es möglich, COX aus Rinderherz in Dodecylmaltosid zu monomerisieren (Suarez *et al.*, 1984). Photometrische Untersuchungen haben gezeigt, daß in Dodecylmaltosid keine Nukleotideffekte an COX zu beobachten sind (Napiwotzki, 1997). Vermutlich handelt es sich bei Messungen in Dodecylmaltosid nicht um physiologische Bedingungen. Deshalb sollte der Effekt von Nukleotiden auf COX aus *S. cerevisiae* und die Aktivitäten der unterschiedlichen Stämme unter "physiologischen" Bedingungen untersucht werden. Durch vergleichende Messungen am deletierten Enzym und am Wildtypenzym sollte die Rolle der Untereinheit VIa bei der Regulation des Holoenzym aufgeklärt werden.

### Aktivitätsmessungen an Cytochrom c Oxidase aus *S. cerevisiae*

Die Ascorbatatmung der COX aus *S. cerevisiae* wurde an Tween-80 solubilisierten Mitochondrien polarographisch mit Hilfe der Clark-Sauerstoffelektrode gemessen. Dabei wurde die Abnahme des Sauerstoffgehaltes des Mediums aufgezeichnet. Die Konzentration der COX in den Mitochondrien wurde photometrisch bestimmt. Aktivitätsmessungen wurden bei 10–25 nM COX und steigenden Konzentrationen Hefe Cytochrom c durchgeführt. Zunächst wurde die Ascorbatatmung des Wildtyps und die der Deletionsmutanten d VIa gemessen und miteinander verglichen. Figur 6 zeigt die Aktivitäten der unterschiedlichen Enzyme in Abhängigkeit von der Cytochrom c Konzentration. Beide Enzyme zeigen eine Sättigungskinetik, jedoch ist eine Abnahme der Aktivität der d VIa-COX im Gegensatz zur Wildtyp COX um ca. 50% zu erkennen. Dieser Effekt kommt ausschließlich durch das Fehlen der Untereinheit VIa in der Deletionsmutante zustande.

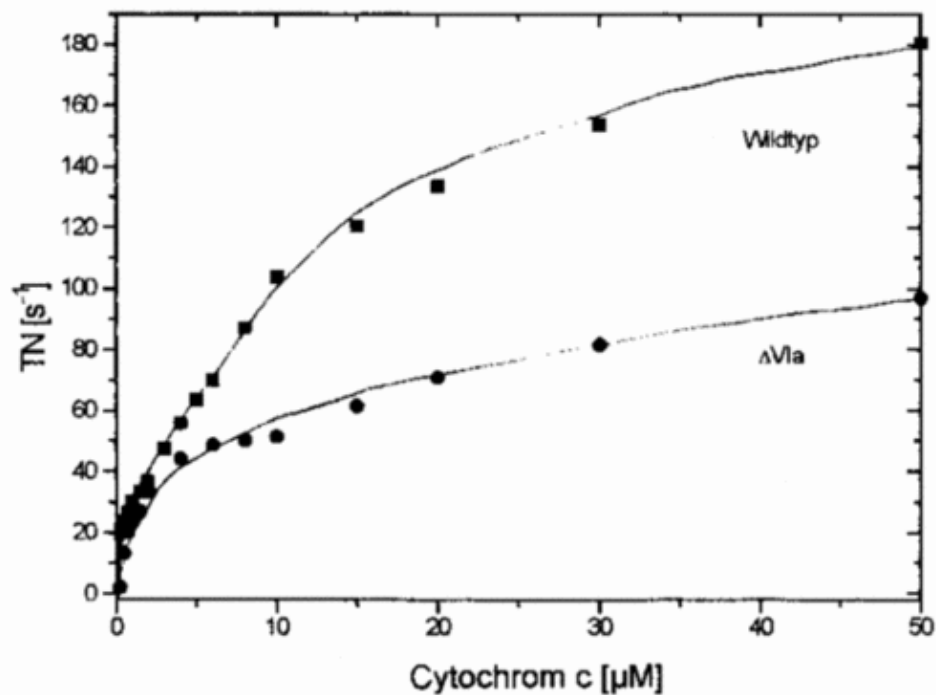
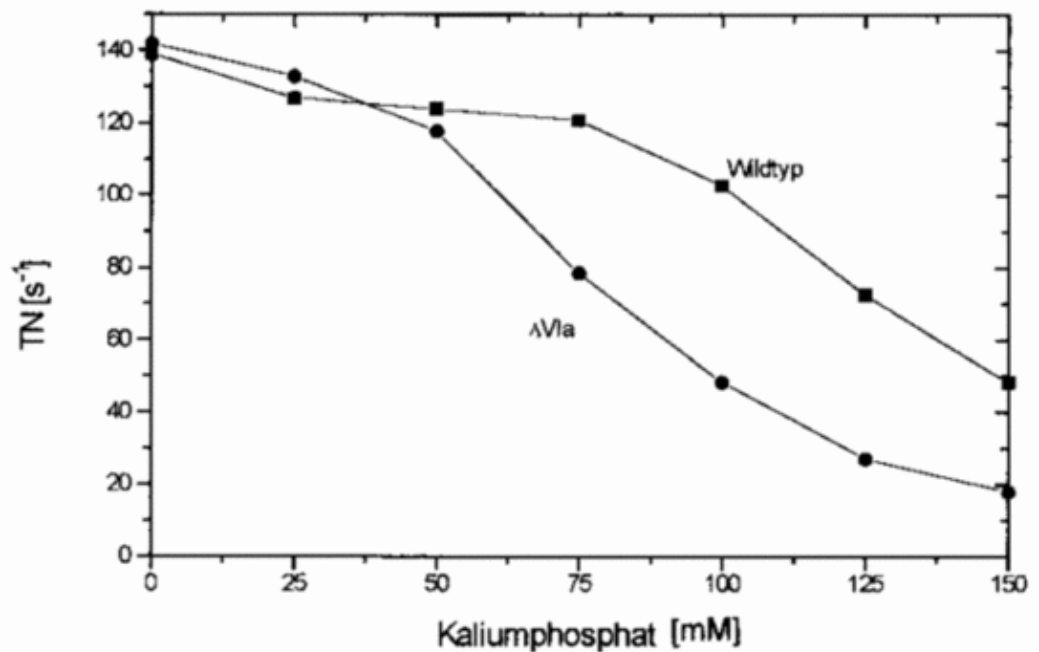


Fig.6: Vergleich der Ascorbatatmung von 10 nM Wildtyp COX und 10 nM d Vla-COX. Die Messungen erfolgten polarographisch an Tween-80 solubilisierten Mitochondrien bei steigenden Cytochrom c Konzentrationen. Quadrate: Wildtyp; Kreise: Deletionsmutante.

Taanman *et al.* (1993) fanden bei photometrischen Messungen an mit 0.1% Dodecylmaltosid solubilisierten Mitochondrien bei niedriger Ionenstärke eine höhere Aktivität der (Vla-COX als beim Wildtyp und eine Stimulierung beider Enzyme durch steigende Kaliumphosphat Konzentrationen. Figur 7 zeigt das Ergebnis analoger Messungen im selben Puffer an der Sauerstoffelektrode. Während bei niedrigen Ionenstärken bis etwa 35 mM Phosphat ebenfalls eine höhere Aktivität der (Vla-COX gemessen werden konnte, konnte keine Stimulierung der Enzyme durch Phosphat festgestellt werden, sondern eine Hemmung durch hohe

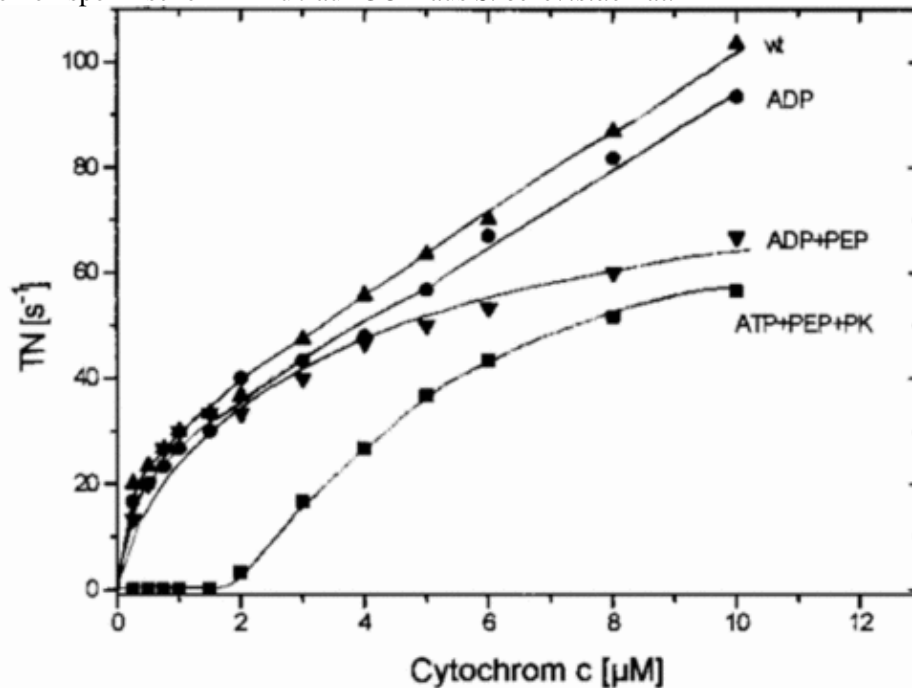


Ionenstärken.

**Fig.7: Effekt der Phosphatkonzentration des Meßpuffers auf die Aktivität von Wildtyp und Deletion. Die Ascorbatatmung wurde polarographisch an Dodecylmaltosid solubilisierten Mitochondrien mit 10 nM COX-Gehalt gemessen. Die Messungen erfolgten bei steigenden Phosphatkonzentrationen.**

## Regulation von Cytochrom c Oxidase durch Nukleotide

Durch weitere Experimente sollte der Effekt von Adeninnukleotiden auf die Regulation der *S. cerevisiae* COX Aktivität untersucht werden. Es sollte insbesondere die Rolle der Untereinheiten VIa und IV untersucht werden, da deren Bedeutung für die Regulation des Rinderenzym bereits nachgewiesen werden konnte (Arnold, 1997; Frank, 1997; Napiwotzki, 1997). Die Aktivitätsmessungen erfolgten an Tween-80 solubilisierten Mitochondrien des Wildtyps und des d VIa-COX Stammes unter Einwirkung der Nukleotide ADP und ATP. Um die Hydrolyse von ATP zu kompensieren, wurde diesen Proben ein ATP-regenerierendes System aus 20 U / mL Pyruvatkinase (Pk) und 10 mM Phosphoenolpyruvat (PEP) zugesetzt (Poyton and Groot, 1975). Zur Kontrolle wurden Messungen mit ADP und PEP durchgeführt, und es wurde überprüft ob PEP einen spezifischen Einfluß auf COX aus *S. cerevisiae* hat.



**Fig.8: Ascorbatatmung von 10 nM COX in Tween-80 solubilisierten Mitochondrien in Abhängigkeit von steigenden Cytochrom c Konzentrationen. Basisdreiecke: Wildtyp; Kreise: 5 mM ADP; Spitzdreiecke: 5 mM ADP und 10 mM PEP; Quadrate: 5 mM ATP, 10 mM PEP und 20 U/mL Pk.**

In Figur 8 sind beim Wildtyp und in Gegenwart von ADP Sättigungskurven zu beobachten. Die Aktivität ist in beiden Fällen etwa gleich. Die Inkubation des Enzyms mit ADP und PEP führt zu einer Hemmung der Aktivität des Enzyms bei hohen Cytochrom c Konzentrationen um ca. 40%, wobei der Kurvenverlauf erhalten bleibt. Setzt man den Mitochondrien jedoch ATP und das ATP-regenerierende System zu, um den ATP/ADP-Quotienten möglichst hoch zu halten, so beobachtet man einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer vollständigen Inhibierung des Enzyms bis 1.5 µM Cytochrom c. Der sigmoidale Verlauf der Hemmung durch ATP konnte durch Messung in Dodecylmaltosid aufgehoben werden (Fig. 9).

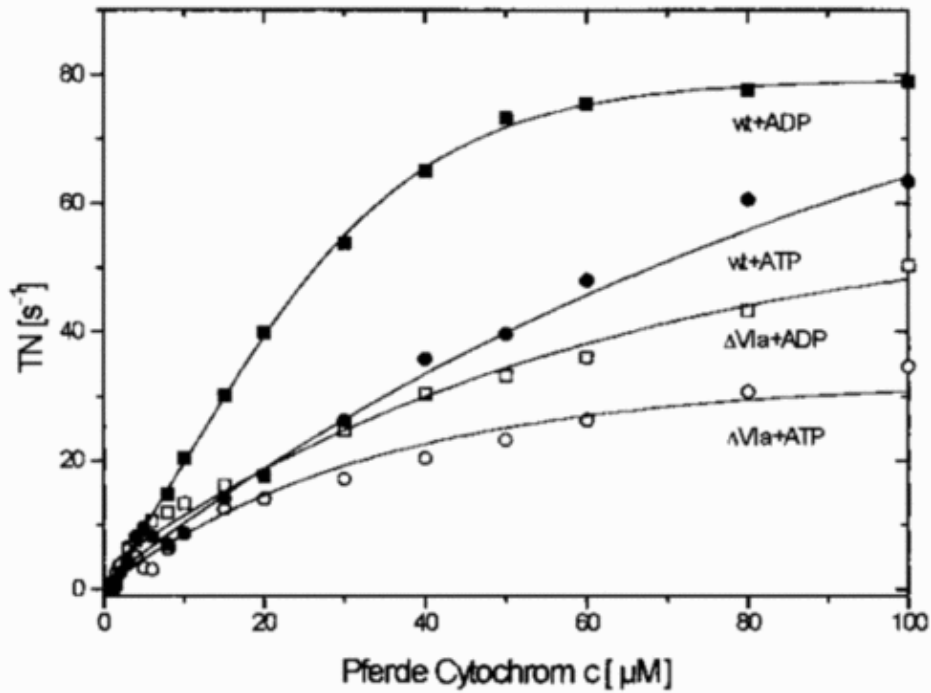
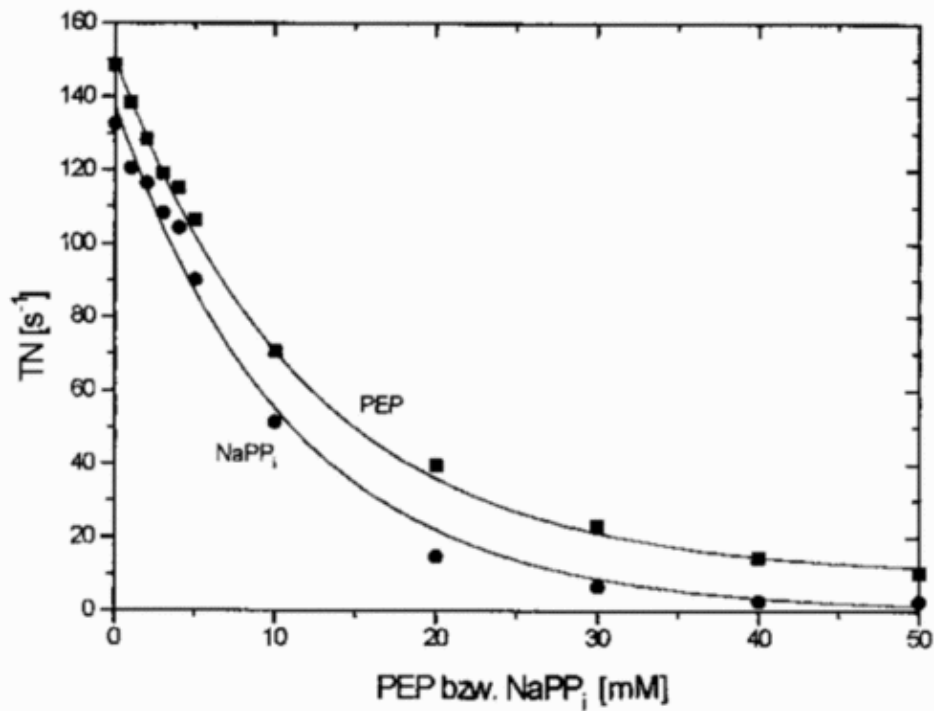


Fig.9: Einfluß von 0.05% Dodecylmaltosid auf die allosterische Hemmung der COX gemessen an solubilisierten Mitochondrien. Geschlossene Quadrate: Wildtyp + ADP; geschlossene Kreise: Wildtyp und ATP; offene Quadrate: Deletionsmutante + ADP; offene Kreise: Deletionsmutante + ATP.

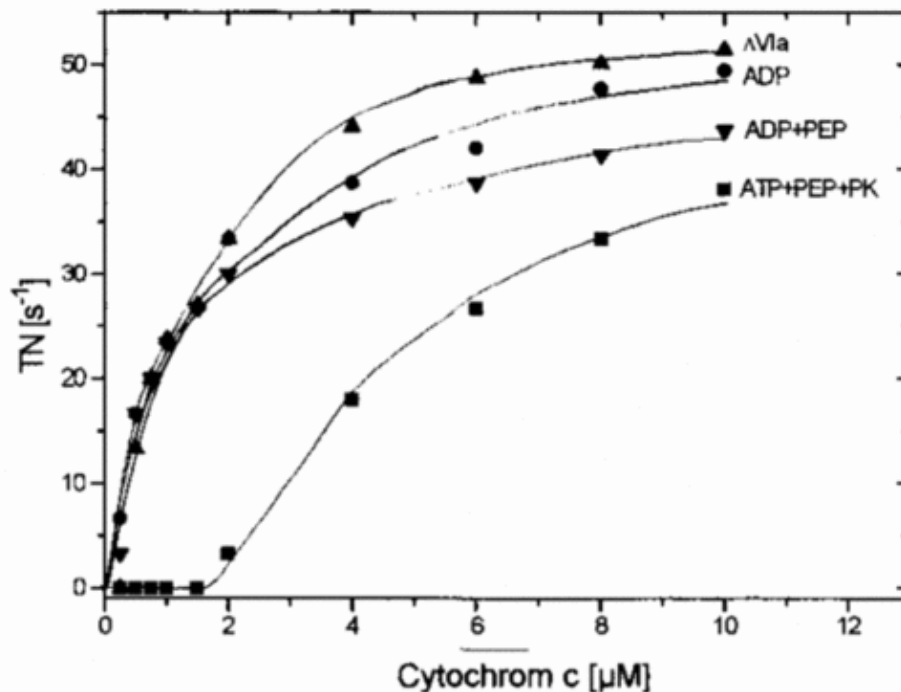
Figur 10 zeigt das Ergebnis einer Kontrollmessung mit steigenden Mengen PEP. Dabei wurde ein spezifischer Effekt von PEP auf COX aus Hefe ausgeschlossen, da eine Titration mit gleichen Konzentrationen Natriumpyro-phosphat ein analoges Ergebnis liefert. Es handelt sich demnach bei der Reduktion der Aktivität um 40% bei Messungen in Gegenwart von ADP und PEP um ionische Effekte.



**Fig.10: Einfluß von steigenden Konzentrationen PEP bzw. NaPP<sub>i</sub> auf die Aktivität von COX. Die Messungen wurden an 25 nM COX in Tween-80 solubilisierten Mitochondrien bei 50 µM Cytochrom c durchgeführt. Quadrate: PEP-Titration; NaPP<sub>i</sub>-Titration.**

### Rolle der kernkodierten Cytochrom c Oxidase Untereinheiten

Aktivitätsmessungen an solubilisierten Mitochondrien der Deletionsmutante d VIa-COX ergaben die in Figur 11 dargestellten Ergebnisse. d VIa-COX und d VIa-COX in Gegenwart von ADP zeigen eine Sättigungskurve der Aktivitätszunahme in Abhängigkeit von der Cytochrom c Konzentration. Auch bei diesem Enzym führt die Zugabe von ADP und PEP zu einer Hemmung. Die Inkubation des Enzyms mit ATP und dem ATP-regenerierenden System bewirkt einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer Inhibierung des d VIa-Enzyms bis 1.5 µM Cytochrom c. Insgesamt liegen die Aktivitäten des deletierten Enzyms ohne Untereinheit VIa etwa 50% unter denen des Wildtyps.

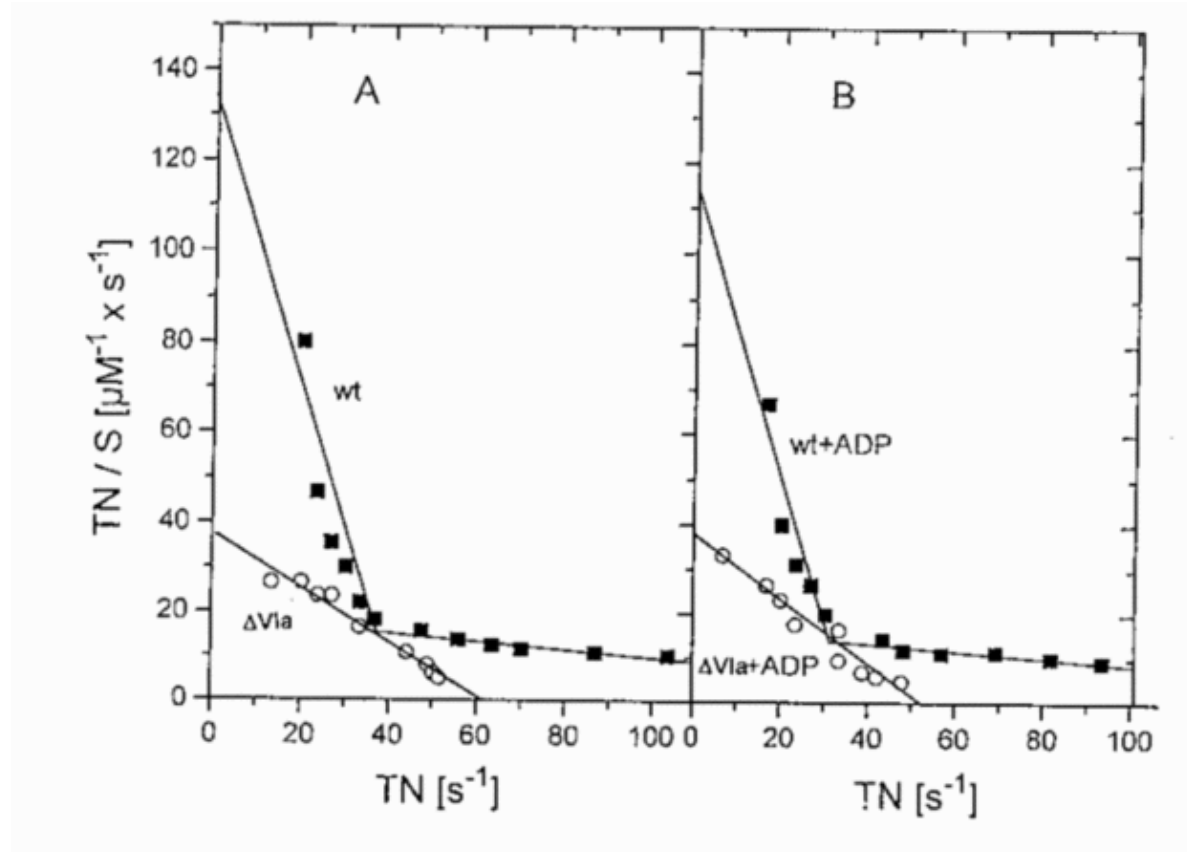


**Fig.11: Ascorbatatmung von 10 nM d VIa-COX in Tween-80 solubilisierten Mitochondrien in Abhängigkeit von steigenden Cytochrom c Konzentrationen. Basisdreiecke: Deletionsmutante; Kreise: 5 mM ADP; Spitzdreiecke: 5 mM ADP und 10 mM PEP; Quadrate: 5 mM ATP, 10 mM PEP und 20 U/mL Pk.**

Da Wildtyp COX und d VIa-COX sich nur durch die Abwesenheit der Untereinheit VIa unterscheiden, die sigmoidale Hemmung des Enzyms aber nicht beeinflusst wird, ist dieser regulatorische ATP-Effekt unabhängig von der Untereinheit VIa. In Abwesenheit von Nukleotiden beeinflusst die Untereinheit VIa die Gesamtaktivität des Enzyms möglicherweise durch eine Änderung der Affinität des Enzyms zu Cytochrom c.

### Messungen zur Cytochrom c Bindung

Es wurde vermutet, daß Carboxylgruppen der Untereinheit VIa an der Bindung von Cytochrom c an COX beteiligt sein könnten (Kadenbach and Stroh, 1984). Mit dem System der Deletionsmutanten der Untereinheit VIa konnte dies genauer untersucht werden. Figur 8 zeigt bei der Titration des Wildtypenzym mit Cytochrom c einen zweiphasigen Kurvenverlauf, der bei der Deletionsmutante nicht auftritt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden mit Hilfe dieser Daten Eadie-Hofstee Diagramme aufgetragen.



**Fig.12 A:** Eadie–Hofstee–Diagramm von COX–Aktivitäten gemessen an Tween–80 solubilisierten Mitochondrien des Wildtyps (geschlossene Quadrate) und der Deletionsmutante d VIa (offene Kreise). Die Daten wurden den Figuren 8 und 11 entnommen. **B:** Eadie–Hofstee–Diagramm von COX–Aktivitäten gemessen an Tween–80 solubilisierten Mitochondrien des Wildtyps (geschlossene Quadrate) und der Deletionsmutante d VIa (offene Kreise) in Gegenwart von 5 mM ADP. Die Daten wurden den Figuren 8 und 11 entnommen.

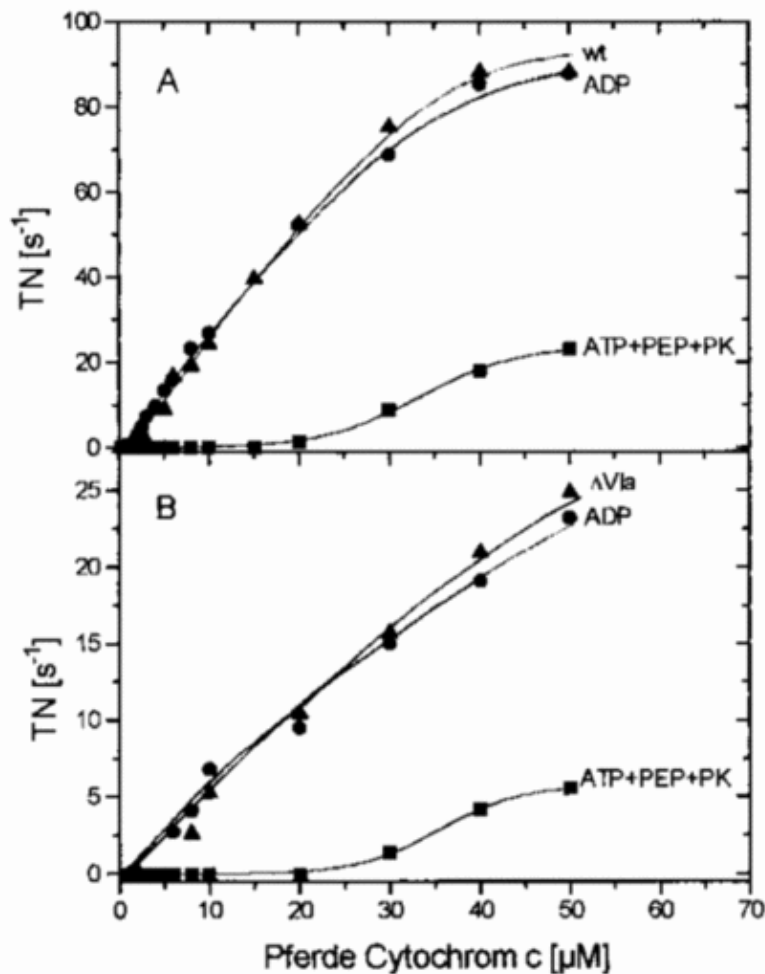
Die Ergebnisse des Eadie–Hofstee Diagramms zeigen deutlich zwei Phasen der Cytochrom c Bindung des Wildtypenzym und nur eine Phase der Cytochrom c Bindung bei der d VIa–Deletionsmutante. Dies gilt auch in der Gegenwart von 5 mM ADP. Anhand der Diagramme konnte die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\text{Max}}$  der COX und die Michaelis–Konstante  $K_M$  der Substratbindung bestimmt werden. Außerdem konnte der Einfluß von ADP auf  $K_M$  verdeutlicht werden. Damit wurde die Beteiligung der Untereinheit VIa an der Cytochrom c Bindung bewiesen.

	Wildtyp	d VIa	Wildtyp+ADP	d VIa+ADP
$v_{\text{Max}} 1 [s^{-1}]$	40,12	61,38	34,97	51,09
$v_{\text{Max}} 2 [s^{-1}]$	208,97		208,85	
$K_M 1 [\mu M]$	0,30	1,62	0,31	0,46
$K_M 2 [\mu M]$	10,97		12,47	

**Tabelle 2:** Auswertung der Eadie–Hofstee–Plots aus Fig.12.  $v_{\text{Max}}$  ist die maximale Geschwindigkeit und  $K_M$  ein Maß für die Affinität der Cytochrom c Bindungsstellen der COX.

COX des Wildtyps besitzt laut Eadie–Hofstee–Plot zwei Bindungsstellen für Cytochrom c. Eine davon hat eine hohe Affinität mit  $K_M = 0.3 \mu M$ , die andere hat eine 36–fach niedrigere Affinität mit  $K_M = 10.97 \mu M$ . Dieser Wert bleibt in Gegenwart von ADP bei der hoch–affinen Bindungsstelle nahezu konstant,  $K_M = 0.31 \mu M$ , während die Affinität der niedrig–affinen weiter abnimmt,  $K_M = 12.47 \mu M$ . Das Enzym der Deletionsmutante der Untereinheit VIa zeigt keine Zweiphasigkeit der Cytochrom c Bindung. Sowohl mit als auch ohne ADP konnte nur eine hoch–affine Cytochrom c Bindungsstelle bestimmt werden. In Abwesenheit von ADP ergibt sich  $K_M = 1.62 \mu M$ , während durch ADP die Affinität zu Cytochrom c auf  $K_M = 0.46$  steigt. COX aus *S. cerevisiae* besitzt demnach zwei Cytochrom c Bindungsstellen pro Monomer. Eine hoch–affine

katalytische und eine niedrig-affine regulatorische, die an der Untereinheit VIa lokalisiert ist. Am Anfang der kinetischen Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit wurden die Aktivitätsmessungen an COX aus *S. cerevisiae* mit Pferde Cytochrom c als Substrat durchgeführt, da dieses routinemäßig für Messungen an Rinder COX verwendet wurde und somit zur Verfügung stand. Ein Vergleich der mit Pferde und Hefe Cytochrom c gemessenen Aktivitäten ergab beim Wildtyp eine 70% niedrigere Aktivität des Hefeenzym mit Pferde Cytochrom c. Bei der Deletionsmutante betrug die Abnahme der Aktivität ca. 90%. Auch Messungen mit Nukleotiden wurden mit Pferde Cytochrom c durchgeführt.



**Abb.x:** Ascorbatatmung von 10 nM COX in Tween-80 solubilisierten Mitochondrien in Abhängigkeit von steigenden Pferde Cytochrom c Konzentrationen. A: Basisdreiecke: Wildtyp; Kreise: 5 mM ADP; Spitzdreiecke: 5 mM ADP und 10 mM PEP; Quadrate: 5 mM ATP, 10 mM PEP und 20 U/mL Pk. B: Basisdreiecke: Deletionsmutante; Kreise: 5 mM ADP; Spitzdreiecke: 5 mM ADP und 10 mM PEP; Quadrate: 5 mM ATP, 10 mM PEP und 20 U/mL Pk.

In Gegenwart von ADP und ADP+PEP ergaben sich analoge Sättigungskurven mit verringerter Aktivität. Bei Messungen in Gegenwart von ATP und dem ATP-regenerierenden System wurde eine zehnmal stärkere Inhibierung des Enzyms bis zu 15 μM Cytochrom c beobachtet als dies mit Hefe Cytochrom c der Fall war (1.5 μM). Für d VIa-COX verhalten sich die Ergebnisse analog, jedoch ist die Aktivität des Enzyms um weitere 70% reduziert. In Gegenwart von ATP und ATP-regenerierendem System findet ebenfalls eine Inhibierung bis 15 μM Cytochrom c statt. Diese Beobachtungen machen deutlich, daß die Struktur von Cytochrom c einen starken Einfluß auf die allosterische Hemmung des Hefeenzym durch ATP hat.

...



# Diskussion

...

## Komplementierungsexperimente

### Heterologe Expression des BHVIa Gens in Hefe

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Expressionssystem für die Untereinheit VIa der COX aus Rinderherz etabliert werden. Ein solches System würde Mutageneseexperimente zur Funktionsaufklärung an Säugetier COX ermöglichen. Gleichzeitig entstand ein System für Mutageneseexperimente an der Untereinheit VIa der Hefe. Durch die Klonierung für die Deletion liegt dieses Gen in einem Plasmid vor, wo es durch Mutagenese verändert werden kann. Untersuchungen an mutierter komplementierter Hefe COX könnten dann Aufschluß über die Rolle einzelner Aminosäuren z.B. bei der Kinetik der Cytochrom c Bindung geben. Um bei kinetischen Untersuchungen einen Einfluß der entsprechenden Rinderuntereinheit auf das heterologe Hefeenzym feststellen zu können, mußte die Untereinheit VIa der Hefe zuvor deletiert werden. Gleichzeitig sollte die Deletionsmutante für kinetische Messungen eingesetzt werden, da ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp und (VIa–COX Erkenntnisse über die Bedeutung der Untereinheit VIa für die Regulation des Enzyms liefert. Die Erzeugung der Deletionsmutante der Untereinheit VIa der Hefe erfolgte mit Hilfe der "one step gene disruption" (Rothstein, 1983; Stearns, 1990). Zur Selektion der Deletionsstämme wurde das COX13 Gen intrachromosomal durch ein Histidin Markergen ausgetauscht. Sporulation der Hefen und anschließende Trennung der Tetraden erzeugte haploide, homozygote *d cox13::HIS3* Deletionsstämme. Die Einführung der Deletion wurde auf der Ebene der chromosomalen DNA durch Southern Blot Analysen überprüft. Dabei konnte der Genotyp der Deletionsmutanten eindeutig als haploid und homozygot *d cox13::HIS3* nachgewiesen werden. Die Überprüfung des Phenotyps erfolgte durch Northern Blot Analysen, Wachstumskontrollen und 2D–Gelelektrophorese von Mitochondrien der Deletionsmutante. Erst nachdem die Deletionsmutante sicher charakterisiert war, wurde mit der Komplementierung begonnen. Die Komplementierung der Deletion sollte durch die Rinderherz COX Untereinheit VIa erfolgen. Dazu mußte das Rinder-gen zunächst kloniert werden. Da es wegen seiner geringen Größe in der Regel nicht in einer *d gt11* cDNA Bank enthalten ist, wurde aus Rinderherz Gesamt–RNA isoliert und daraus mit Reverser Transkriptase cDNA erzeugt. Aus dieser konnte das Rinderherzgen mit genspezifischen Primern amplifiziert werden. Nach der Kontroll–Sequenzierung wurde das Gen zur Komplementierung in einen Shuttle–Vektor umkloniert. In diesem Vektor befindet sich das Gen unter der Kontrolle des konstitutiven und starken Plasma–Membran–ATPase Promotors. Außerdem besitzt der Vektor einen "2–µm" Replikationsursprung für eine hohe Kopienzahl. Die Selektion der Transformanten erfolgte nach Leucin Prototrophie. Durch Northern Blot Analysen konnte die Expression der mRNA des Rinderherzgens der Untereinheit VIa in der Hefe nachgewiesen werden. Um sicher gehen zu können, daß die heterologe Untereinheit BHVIa nicht während der Enzymisolation verloren geht, wurden Western Blots mit Mitochondrien des Komplementierungsstammes durchgeführt. Die Untereinheit BHVIa sollte mit dem monoklonalen Antikörper 378 gegen Rinderherz COX Untereinheit VIa und VIc in der Hefe nachgewiesen werden. Kreuzreaktivität des Antikörpers zwischen Hefe VIa und BHVIa wurde im Experiment ausgeschlossen. In Hefemitochondrien des Komplementierungsstammes konnte kein BHVIa Protein detektiert werden. Da die mRNA des Gens vorhanden ist, liegt dies möglicherweise an der fehlenden Translation, wodurch in den Stämmen das Protein nicht gebildet würde. Eine andere Möglichkeit ist mangelnder Import des Proteins durch Strukturunterschiede des Hefe– und des Rinderproteins. Ein Vergleich der Precursorsequenzen der beiden Proteine zeigt für diesen Bereich tatsächlich so gut wie keine Homologie:

BHVIa	MALPLKSLSRGL	–1
	:	
yVIa	MFRQCAKRYA	

**Abb.26:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Precursor der COX Untereinheiten VIa aus Rinderherz (oben) und *S. cerevisiae* (unten). –1 bezeichnet die letzte Aminosäure der Precursor vor dem Beginn der maturierten Proteine. Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Die Punkte zwischen den Sequenzen zeigen Identität an.

Als eine der Erkennungssequenzen von mitochondrialen Peptidasen enthalten beide Precursor eine basische Aminosäure an Position –3, die die Prozessierung ermöglichen sollte (Maarse *et al.*, 1984). Zwar enthalten beide Precursorsequenzen die charakteristischen positiven Aminosäuren und keine negativen Aminosäuren, jedoch enthält der BH–Precursor eine positive Aminosäure weniger. Aufgrund dieser und struktureller Unterschiede kommt es wahrscheinlich zu keinem Import der BHVIa Untereinheit in die Mitochondrien der Hefe. Da das Protein auch nicht in der Außenmembran der Mitochondrien zu finden ist, ist der Import vollständig gehemmt und nicht nur die Prozessierung bzw. Assemblierung des Proteins gestört. Um die Wahrscheinlichkeit des Imports des Rinderproteins in die Hefemitochondrien zu erhöhen, wurde die Komplementierung mit einem Genkonstrukt wiederholt. Durch dieses Konstrukt wurde die Präsequenz des Rindergens BHVIa gegen die Präsequenz des Hefe COX13 Gens ausgetauscht, um so den Import des Rinderproteins in die Hefemitochondrien zu ermöglichen. Auch bei diesen Komplementierungsstämmen wurde die Expression der mRNA des Genkonstruktes nachgewiesen. Mitochondrien dieses Stammes zeigten im Western Blot kein BHVIa Protein. Das Rinderprotein wurde demnach auch mit vorgeschaltetem Hefeprecursor nicht in die Hefemitochondrien importiert. Dieses Ergebnis wurde mit polyklonalen Antikörpern nochmals überprüft. Setzt man voraus, daß die Translation der mRNA des Rindergens zum Protein stattfindet und nur der Import des Proteins gehemmt ist, sollte innerhalb ganzer Hefezellen das Rinderprotein vorhanden sein. Um dies zu prüfen, wurden ganze Hefezellen fraktioniert und durch Western Blot Analysen untersucht. In den Zellen konnte die Rinderherz Untereinheit VIa der COX nicht nachgewiesen werden. Kinetische Messungen der Ascorbatatmung solubilisierter Mitochondrien unterstützen die Ergebnisse der Western Blots. Eine Assemblierung des Rinderproteins in Hefe COX sollte die Gesamtaktivität des Holoenzym verändern. Beide Komplementierungsmutanten zeigen jedoch die gleiche Aktivität wie die Deletionsmutante, weshalb vermutet werden kann, daß es sich um deletierte COX mit 10 statt 11 Untereinheiten und nicht um heterologe, komplementierte COX handelt.

## Ergebnis der heterologen Komplementierung bei Cytochrom c Oxidase

Hefe stellt ein beliebtes System für die heterologe Expression von Proteinen und für das Screenen nach unbekannten Genen anderer Organismen durch Komplementierungsversuche dar. Bei der Expression von heterologen Proteinen in Hefe handelte es sich zumeist um monomere Proteine (Scarpulla and Nye, 1986; Lee and Nurse, 1987) oder vollständige Enzymkomplexe eines fremden Organismus (Heinisch, 1993). Auch die korrekte Lokalisierung von heterologen Proteinen in Hefe ist nicht immer gewährleistet. Bei der Expression des transmembranen Komplexes der Pflanzen–ATPase in Hefe gelangte diese beispielsweise nicht in die Mitochondrienmembran sondern blieb im Endoplasmatischen Reticulum. (Villalba *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, Untereinheiten eines transmembranen Multiproteinkomplexes verschiedener Organismen heterolog zu exprimieren und zu assemblieren. Offensichtlich scheitert dies an der hohen Spezifität der Protein–importierenden Enzyme der Mitochondrienmembran und an den evolutionsbedingten Unterschieden zwischen der Untereinheit VIa der Hefe COX und der Untereinheit VIa der Rinderherz COX. Ein Sequenzvergleich des Hefeproteins und des Rinderproteins ergibt nur 35% Homologie, wobei der C–terminale Bereich die größere Homologie besitzt. Der Import der COX Untereinheiten in die Mitochondrien erfolgt mit dem N–Terminus voran, so daß dieser die größere Bedeutung für die Spezifität des Imports besitzt.

```

          *          *          *          *          *
yVIa      ASSLPPNALKPAFGPPDKVAAQKFKESLMATEKHAKDTSNMWVKISVWVALPAIALT
: :                               : :                               : :
BHVIa      AS-----AAKGDHGGTGARTWRFLTFGLALPSVALC

          *          *          *          *          *
yVIa      AVNTYFVEKEHAHREHLKHVPDSEWPRDYEFMNIRSKPFFWGDGDKTLFWNPVVNR
: :       : : : :       : :       : : : : : : : : : : : : : : : :
BHVIa      TLN----SWLHSGHRERPAFIP-----YHHLRIRTKPFSWGDGNHTFFHNPRVNP

          *
yVIa      HIEHDD
BHVIa      LPTGYEKP

```

**Abb.27: Sequenzvergleich der Untereinheiten VIa aus *S. cerevisiae* (oben) und Rinderherz (unten). Doppelpunkte zwischen den Aminosäuren zeigen Identität. Die Sterne über der Sequenz bezeichnen die Numerierung der As in Zehnerschritten. Bei dick gedruckten Aminosäuren handelt es sich um bei Säugetieren konservierte Aminosäuren.**

Bei den fett gedruckten Aminosäuren der Sequenz handelt es sich um Aminosäuren die bei Rattenherz, Menschenherz und Rinderherz COX Untereinheit VIa konserviert sind. Gegenüber dem Hefeprotein sind bei Säugetieren viel mehr Aminosäuren homolog. Die Abtrennung der Untereinheit VIa der Hefe im phylogenetischen Stammbaum erfolgte bereits vor 581 My, wonach sich die Untereinheiten in eigene Richtungen veränderten (Saccone, 1990; Exner, 1997). Möglicherweise sind dadurch geringfügige strukturelle Variationen entstanden, die den Austausch der Untereinheiten zwischen Hefe und Rind verhindern. In keinem Western Blot konnte die Untereinheit BHVIa nachgewiesen werden, unabhängig davon welche Fraktion der Zellen bzw. Mitochondrien untersucht wurde. Studien über die Stabilität einzelner Untereinheiten an COX aus *S. cerevisiae* haben ergeben, daß nur assemblierte Untereinheiten der COX stabil gegenüber proteolytischem Abbau sind (Glerum *et al.*, 1995; Glerum and Tzagoloff, 1997). Gleichzeitig ist nur der intakte Enzymkomplex vor dem Abbau durch endogene Proteasen geschützt. Ausnahmen sind Mutationen in den Hefe–Untereinheiten VIa, VIb und VIII, die die Stabilität des Holoenzym nicht verändern. Von allen kernkodierten Untereinheiten sind im Cytosol nur sehr niedrige "steady state" Konzentrationen der Proteine vorhanden. Wie bereits beschrieben, wird BHVIa weder mit noch ohne Hefeprecursor in die Mitochondrien importiert. Die Proteine sind offenbar im Cytosol nicht vor Proteasen geschützt und werden sofort proteolytisch abgebaut. Sie sind deshalb auch in ganzen Hefezellen nicht nachzuweisen. Das Gen der Untereinheit BHVIa wurde in den Hefen durch einen starken Promotor kontrolliert und lag in mehreren Kopien vor. Ein Verlust des Plasmides während des Wachstums der Hefen wurde durch Wachstumskontrollen in Selektionsmedien regelmäßig ausgeschlossen. Bei der Expressionskontrolle durch die Northern Blots konnten erhöhte RNA Konzentrationen im Vergleich zum Rind festgestellt werden. Dadurch ist auszuschließen, daß die Untereinheit in substöchiometrischen Mengen in der COX enthalten ist und in den Western Blots nicht detektierbar war. Diese Arbeiten zeigen Grenzen für die Nutzung von Hefe als Expressions–system für transmembrane heterologe Multiproteinkomplexe. Möglicherweise stellen Zellkulturen ein besseres System für die Expression und Mutagenese von Untereinheiten eukaryotischer COX dar. Entsprechende Systeme befinden sich im Aufbau (Grossman, persönliche Mitteilung). Allgemein scheint der Austausch von Proteinen der COX zwischen verschiedenen Organismen schwierig. Versuche, ein Konstrukt aus der transmembranen Domäne der Rhodobacter sphaeroides Untereinheit II und dem extramembranen Bereich der Ratten Untereinheit II der COX in *Rh. sphaeroides* zu exprimieren, gelangen ebenfalls nicht (Ferguson–Miller, persönliche Mitteilung).

## Untersuchungen zum Precursor des Rinderleber Untereinheit VIa Gens

Ein Problem bei der Amplifikation von unbekannten 5´–Bereichen von Genen durch 5´–RACE–PCR sind Sekundärstrukturen der mRNA. Gerade bei den Genen der Leber–Isoformen von Untereinheiten der COX wurden diese Strukturen ermittelt. Für einige Gene der Leber–Isoformen, so auch für das BLVIa Gen, sind bis jetzt keine Präsequenzen identifiziert worden. Da die Sequenzen der Untereinheit VIa von humaner Leber, Rattenleber und maturierter Rinderleber ca. 90% Homologie besitzen und für die beiden ersten Gene Präsequenzen bekannt sind, sollte auch das BLVIa Gen eine Präsequenz enthalten. In dieser Arbeit wurde versucht, eine Präsequenz des Rinderlebergens BLVIa durch 5´–RACE–PCR zu amplifizieren. Dazu wurden bei der Reaktion der Reversen Transkriptase zusätzliche Denaturierungsschritte eingefügt, um etwaige Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen (Exner, 1997). Alle untersuchten und sequenzierten Klone begannen mit der von Ewart *et al.* (1991) veröffentlichten Sequenz des maturierten Proteins und enthielten keine Präsequenz. Dies ist ein ungeklärtes experimentelles Problem, da das BLVIa Gen aus den oben genannten Gründen mit großer Wahrscheinlichkeit doch eine Präsequenz besitzt.

## Kinetische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase aus *S. cerevisiae*

Der regulatorische Einfluß von Nukleotiden auf COX und deletierte d VIa–COX aus *S. cerevisiae* wurde von Taanman *et al.* (1993, 1994) untersucht. Durch photometrische Untersuchungen zeigten sie eine erhöhte Aktivität des (VIa–Enzyms bei niedrigen Ionenstärken im Vergleich zum Wildtypenzym und eine Stimulierung des deletierten Enzyms durch ATP. Bindungsstudien mit dem fluoreszierenden ATP analogen

TNP–ATP ergaben zwei Bindungsstellen am Hefeenzym, von denen sich eine an der Untereinheit VIa befindet. Diese Ergebnisse stützen sich auf photometrische Messungen, die in Dodecylmaltosid–haltigen Puffern durchgeführt wurden. Napiwotzki konnte in seinen Arbeiten zeigen, daß die Wirkung von Nukleotiden auf COX bei photometrischen Messungen abhängig vom Detergenz ist. In Gegenwart von Dodecylmaltosid war kein Unterschied zwischen mit ADP und mit ATP inkubierter COX messbar. Zudem monomerisiert Dodecylmaltosid die COX Dimere, so daß kooperative Wechselwirkungen zwischen den Monomeren verloren gehen. In dieser Arbeit wurden die kinetischen Messungen an mit Tween–80 solubilisierten Hefemitochondrien unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt. Unter analogen Bedingungen konnten bereits Nukleotideffekte an solubilisierten Thunfischmitochondrien gezeigt werden (Arnold, 1997). Dabei wurden neue Erkenntnisse zur Atmungskontrolle in Mitochondrien gewonnen. Bislang wurde angenommen, ADP stimuliere die ATP–Synthase, wodurch es zu einer Senkung des Membranpotentials komme. Diese Senkung führe zu einer Erhöhung der COX Aktivität (Nicholls and Ferguson, 1992). Im Gegensatz dazu wurde die allosterische Hemmung der COX durch ATP gezeigt (Arnold and Kadenbach, 1997). Diese allosterische Hemmung resultiert aus dem Austausch von ADP durch ATP an der Untereinheit IV der COX bei hohen ATP/ADP–Verhältnissen in der Matrix. Hill Plots zeigen eine kooperative Wechselwirkung zwischen zwei Cytochrom c Bindungs–stellen wahrscheinlich an den beiden Monomeren des Dimers (Tsukihara *et al.*, 1996). Diese allosterische Inhibierung existiert nicht bei COX aus *Rh. sphaeroides* (Follmann *et al.*, 1998), da diesem Enzym, wie dem aus den meisten Prokaryoten, die Untereinheit IV fehlt. Die Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus der Regulation der Atmung bei Eukaryoten sollte durch Messungen an COX aus *S. cerevisiae* bewiesen werden, die man in der Evolution zwischen *Rh. sphaeroides* COX und Rinder COX stehend betrachten kann. Die Messungen der COX Aktivität an solubilisierten Hefemitochondrien zeigten bei hohem ATP/ADP–Verhältnis eine allosterische Hemmung des Enzyms bis 1.5  $\mu\text{M}$  Cytochrom c. Diese wurde auch an Untereinheit VIa deletierter COX gemessen, wobei insgesamt niedrigere Aktivitäten vorlagen. Die Allosterie der Hemmung ist bei Rind und Hefe ähnlich und zudem unabhängig von der Untereinheit VIa. Auch bei Hefe handelt es sich um die Kooperativität zweier Cytochrom c Bindungsstellen im Dimer, da der Effekt am monomeren Enzym in Dodecylmaltosid nicht auftritt. Inkubation des Rinderenzym mit einem Antikörper gegen die Untereinheit IV hob die Allosterie der Hemmung auf. Bereits zuvor wurden sowohl auf der cytosolischen Seite als auch auf der Matrixseite der Rinderuntereinheit IV Bindungsstellen für ATP lokalisiert (Reimann *et al.*, 1988; Napiwotzki *et al.*, 1997). Die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten IV von Hefe und Rind sind zu 22% identisch (Kadenbach *et al.*, 1987). Die Untereinheit IV der Hefe enthält mindestens eine dem Rind analoge ATP–Bindungsstelle auf der Matrixseite. Die Regulation der Atmung durch allosterische Inhibierung der COX ist also ein für Eukaryoten gültiger Mechanismus, der energetische Vorteile beinhaltet. Es muß in der Zelle nur ein konstantes niedriges Membranpotential aufrecht gehalten werden (Wan *et al.*, 1993). Dadurch wird die Durchlässigkeit von Membranen für Protonen verringert (O'Shea *et al.*, 1984) und so die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung erhöht. Zusätzlich verhindert ein geringes Membranpotential die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Korshunov *et al.*, 1997).

## Die Cytochrom c Bindung

Das basische Protein Cytochrom c bindet an COX durch ionische Wechsel–wirkung seiner positiv geladenen Lysin–Aminogruppen (Ferguson–Miller *et al.*, 1978) mit negativ geladenen Carboxylgruppen in der Umgebung des  $\text{Cu}_A$  in der Untereinheit II (Witt *et al.*, 1998). Messungen der COX–Aktivität in Gegenwart von ATP und dem ATP–regenerierenden System mit Pferde Cytochrom c ergaben eine zehnmals stärkere allosterische Hemmung des Enzyms als analoge Messungen mit Hefe Cytochrom c. Während mit Hefe Cytochrom c die Hemmung bis 1.5  $\mu\text{M}$  auftrat, wurde sie mit Pferde Cytochrom c bis 15  $\mu\text{M}$  gemessen. Die Struktur des Cytochrom c hat demnach einen Einfluß auf die allosterische Hemmung der COX. Die Aminosäuresequenzen von Pferde Cytochrom c und Hefe Cytochrom c zeigen 69% Homologie.

```

ycytc  GSAKKGATLF KTRCLQCHTV EKGPPHKVGP NLHGIFGHRS GQAEGYSYTD
      :  ::  :      : ::::: ::::: :: :: ::::: ::      ::: :  ::
hcytc  GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGKHKHTGP NLHGLFGRKT GQAPGFTYTD

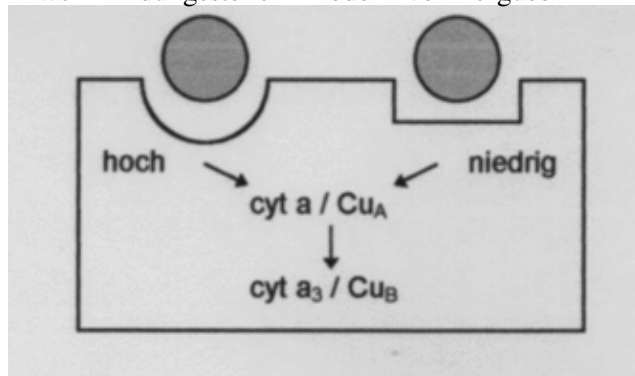
ycytc  ANIKKNVLWD ENNMSEYLTN PKKYIPGTMK AFGGLKKEKD RNDLITYLKK
      :: :  :  :      ::: : ::::: ::::: : : :: : ::::: ::::
hcytc  ANKNKGITWK EETLMEYLEN PKKYIPGTMK IFAGIKKKTE REDLIAYLKK

ycytc  AC-E 103

```

**Abb.28: Aminosäuresequenzen von Iso-1-Cytochrom c der Hefe (oben) und Pferd (zweite Zeile). Doppelpunkte zwischen den Sequenzen zeigen Identität. Die basischen Lysine, die in beiden Sequenzen konserviert vorkommen, sind fett hervorgehoben. Das an der Elektronenübertragung beteiligte Phe82 ist unterstrichen (Rafferty et al., 1996).**

Basische Aminosäuren des Cytochrom c wurden von verschiedenen Autoren als an der Bindung des Cytochrom c an COX beteiligt identifiziert (Ferguson-Miller *et al.*, 1978; Hildebrandt *et al.*, 1993). Für weitere Aminosäuren wurde ihre Rolle bei der Elektronenübertragung aufgeklärt (Mulligan-Pullyblank *et al.*, 1996; Rafferty et al., 1996). Besonders Lys72, Lys79 und Phe82 sind wesentlich an der Bindung und Elektronenübertragung des Cytochrom c beteiligt. Diese Aminosäuren sind bei Hefe und Pferd konserviert und damit sicher nicht allein für die geringere Reaktivität des Pferdeproteins mit der COX verantwortlich. Auch die Raumstruktur des Cytochrom c hat offenbar einen Einfluß auf die Bindung. Dies erklärt die niedrigeren Aktivitäten bei Messungen mit Pferde Cytochrom c am Wildtypenzym. Bei der oben beschriebenen ATP-Bindung an der Matrixseite der Untereinheit IV findet möglicherweise eine konformative Änderung statt, die indirekt die Bindungsstelle für Cytochrom c verändert. Die Untereinheit IV liegt in unmittelbarer Nähe der Untereinheit II und dem Elektronenakzeptor Cu<sub>A</sub> (Tsukihara *et al.*, 1996). Durch die Konformationsänderung sind höhere Cytochrom c Konzentrationen nötig, um das erste Molekül Cytochrom c an COX zu binden. Das Auftreten von zweiphasigen Kinetiken bei COX hat zu vielen Modellen für die Bindung von Cytochrom c geführt (Cooper, 1990). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen das "Zwei-Bindungsstellen-Modell" von Ferguson-Miller *et al.*, 1976.



**Abb.29: Schematische Darstellung des von Ferguson-Miller *et al.* 1976 entwickelten "Zwei-Bindungsstellen-Modells" zur Bindung von Cytochrom c an COX. Entnommen aus Cooper (1990).**

Dieses Modell enthält eine hoch-affine katalytische Bindungsstelle und eine niedrig-affine regulatorische Cytochrom c Bindungsstelle am Monomer (Garber and Margoliash, 1990), wobei die Elektronen wahrscheinlich nicht direkt auf CuA übertragen werden (Reimann *et al.*, 1993). Die Deletion der Untereinheit VIa der COX aus *S. cerevisiae* verändert die zweiphasige Kinetik der COX. Eadie-Hofstee Diagramme für Aktivitätsmessungen am Wildtypenzym zeigen einen zweiphasigen Verlauf, während nach der Deletion der Untereinheit VIa ein einphasiger Verlauf auftritt. Dies gilt auch in Gegenwart von 5 mM ADP. Berechnungen von KM ergaben, daß eine hoch-affine Bindungsstelle bei der Deletionsmutanten erhalten bleibt, während die niedrig-affine fehlt. Frühere Studien haben gezeigt, daß einige saure Aminosäurenreste der Untereinheit VIa von Schweine COX an der Cytochrom c Bindung beteiligt sind (Kadenbach and Stroh, 1984). An der Untereinheit VIa der Hefe handelt es sich dabei um einige der in der Sequenz fett hervorgehobenen sauren Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins. Sie befinden sich im Intermembranraum und sind so für Cytochrom c zugänglich.

		*		*		*		*		*
yVIa	ASSLPPNAL	KPAFGPPDKVAAQKF	KESLMATEKHAKDTSNMWVKISVWVAL							
		:		:		:		:		:
BHVIa	A-----	SAAKGDHG-----	GTGARTWRFLTFGLAL							
		:		:		:		:		:
BLVIa	S-----	SGAHGEEG-----	SARMWKALTTFVAL							
		*		*		*		*		*
yVIa	PAIALTAVNTYFVEKEHA	EHREHLKHVPDSE--WP--	RDYEFMNIRSKPFF							

```

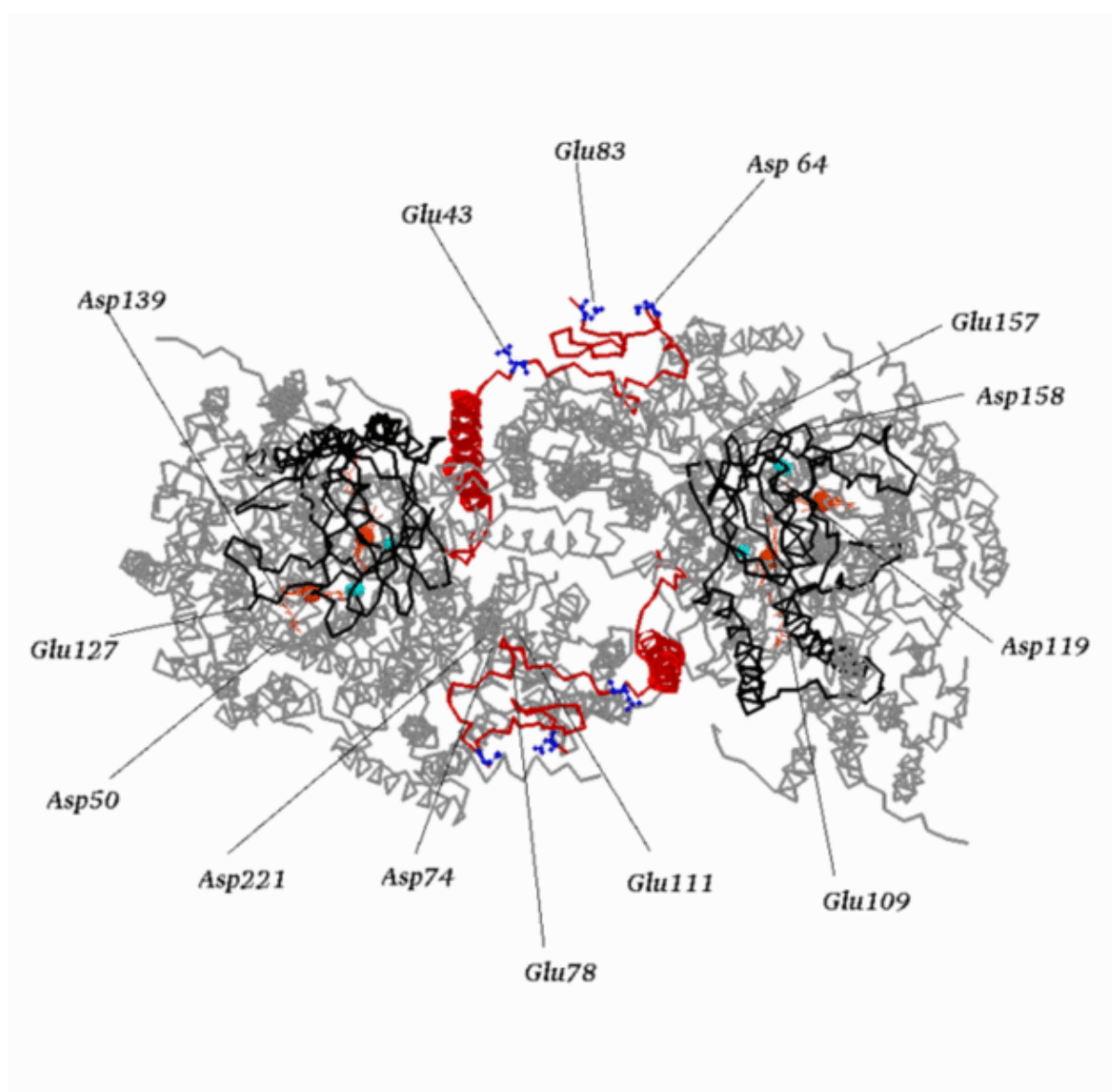
      :       :       :       :       :       :       :       :
BHVIa  PSVALCTLNSW-LHSGHR-----E--RPAFIPYHHLRIRTKPFS
      :       :       :       :       :       :       :       :
BLVIa  PGVGVSMLNVF-MKSHHG-----EEERPEFVAYPHLRIRSKPFP

      *           *
yVIa   WGDGDKTLFWNPVVNRHIEHDD 120
      : : : : : : : :
BHVIa  WGDGNHTTFHNPRVNPLPTGYEKP 85
      : : : : : : : :
BLVIa  WGDGNHTLFHNPHVNPLPTGYEDE 85

```

**Abb.30: Aminosäuresequenz des maturierten Proteins der Untereinheit VIa der Hefe, der Rinderherz Untereinheit VIa und der Rinderleber Untereinheit VIa. Die Sterne über der Sequenz bezeichnen Zehnerschritte. Homologien zwischen allen drei Untereinheiten sind durch Doppelpunkte gekennzeichnet. Alle sauren Aminosäuren der Proteine sind fett gedruckt. Der transmembrane Bereich des Hefe Proteins ist unterstrichen. Der kursive Bereich entspricht der von Taanman *et al.* postulierten cytosolischen ATP-Bindungsstelle.**

In der Abbildung 31, der Struktur der Rinderherz COX, ist die Untereinheit VIa rot hervorgehoben. Die blau eingezeichneten sauren Aminosäuren Glu43 und Glu83 sind aufgrund ihrer Anordnung an der cytosolischen Oberfläche der COX möglicherweise an der regulatorischen Bindung von Cytochrom c beteiligt. Ebenfalls blau gekennzeichnet ist die Aminosäure Asp64. Sie liegt innerhalb des Walker-Motives einer ATP-Bindungsstelle und ist deshalb vermutlich nicht Teil der Cytochrom c Bindungsstelle. Da für das Hefeenzym eine ähnliche Struktur wie für das Rinderherzenzym angenommen wird, sind dort Aminosäuren an vergleichbaren Positionen ebenfalls zur cytosolischen Oberfläche orientiert und für Cytochrom c zugänglich. Es sind die Aminosäuren an den Positionen Glu117, Asp119 und Asp120 der Untereinheit VIa der Hefe die im Bereich der BHVIa Aminosäure Glu83 liegen. Außerdem könnte die Aminosäure Glu43 der BHVIa an der Cytochrom c Bindung beteiligt sein, da sie bei Rinderherz- und Leberisoform und Hefe konserviert ist. Sie liegt auf der cytosolischen Seite in Nähe zur Untereinheit II. Analog handelt es sich bei Hefe um Glu82. Das beim Rind innerhalb des Walker-Motives gelegene konservierte Asp64 entspricht in Hefe Asp101. Alle erwähnten Aminosäuren befinden sich nah beieinander und sind räumlich von denen der katalytischen Cytochrom c Bindungsstelle getrennt. In der Aminosäuresequenz der Hefeuntereinheit VIa befinden sich im C-terminalen Bereich mehr saure als basische Aminosäuren, wodurch die niedrig-affine Cytochrom c Bindung möglich sein könnte.



**Abb.31:** Kristallstruktur der dimeren, oxidierten COX aus Rinderherz. Die Daten von Tsukihara et al., 1996 wurden der Proteindatenbank Brookhaven entnommen und mit dem Programm RasMol 2.6 bearbeitet. Farblich markiert wurden die Untereinheiten II (hellblau), VIa (rot), Häm a und a<sub>3</sub> (orange), die Kupferzentren CuA und CuB (violett), die Magnesiumzentren (grün) und die Zinkatome (rosa). Die Atome der Aminosäuren Glu43, Asp64 und Glu83 der Untereinheit VIa sind blau hervorgehoben. Schwarz eingezeichnete Aminosäuren wurden von Tsukihara et al. 1996 als an der Cytochrom c Bindung beteiligt identifiziert. A zeigt die Aufsicht auf die cytosolische Seite des Enzyms, B eine Seitenansicht der Membranebene.

In dieser Arbeit wurde wahrscheinlich gemacht, daß durch die Deletion der Untereinheit VIa eine von zwei Cytochrom c Bindungsstellen der COX entfernt wurde. Die verringerte Aktivität der Deletionsmutanten im Vergleich zum Enzym des Wildtyps bedingt eine Kooperativität der beiden Bindungsstellen. Fehlt die regulatorische Cytochrom c Bindungsstelle, sinkt die Gesamtaktivität des Enzyms. Da auch Bakterien die zweiphasige Kinetik der COX zeigen, tragen dort eventuell saure Aminosäuren der Untereinheit III zur Bindung des zweiten Moleküls Cytochrom c bei.

## Rolle der kernkodierten Untereinheiten bei der Cytochrom c Bindung

Für die Regulation der COX durch das hohe ATP/ADP-Verhältnis an der Untereinheit IV wurde anhand von Hill Plots die Kooperativität zwischen Bindungsstellen am jeweils anderen Monomer des Dimers postuliert, auch da der Effekt nicht am monomerisierten Enzym gemessen wurde (Arnold, 1997). Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit für COX aus *S. cerevisiae* bestätigt. Gleichzeitig konnte die Rolle der Untereinheit VIa bei der Cytochrom c Bindung aufgeklärt werden. Beide Effekte treten nebeneinander auf, so daß am Dimer vier Cytochrom c Bindungsstellen vorhanden sein müssen: Zwei katalytische, die jeweils über die

Untereinheit IV mit denen des anderen Monomers wechselwirken, und zwei regulatorische an der Untereinheit VIa, die mit der katalytischen desselben Monomers wechselwirken.

---

...



# Zusammenfassung

...

---

Die Untereinheit VIa der Rinderherz COX (BHVIa) sollte mit dem Enzym aus Hefe assembliert werden. Die Deletion der Untereinheit VIa des Hefeenzymen erfolgte durch homologe Rekombination im Genom. Sporulation der transformierten Hefestämme und Trennung der Tetraden erzeugte homozygote, haploide *d cox13::HIS3* Deletionsmutanten. Die Selektion deletierter Stämme erfolgte nach Histidin Prototrophie. Der Genotyp der Mutanten wurde durch Southern Blot und Northern Blot überprüft. Wachstumskontrollen in nichtfermentierbaren Medien und zweidimensionale Gelelektrophorese bestätigten die Deletion der COX Untereinheit VIa. Hefestämme wurden mit dem BHVIa Gen transformiert und nach Histidin und Leucin Prototrophie selektiert. Durch RNA Analysen wurde die Expression des BHVIa Gens in Hefe nachgewiesen. Der Phenotyp dieser Komplementierungsstämme wurde durch das Wachstum in nichtfermentierbaren Medien und durch Western Blot Analyse untersucht. In Hefemitochondrien konnte die Untereinheit VIa der Rinderherz COX nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Komplementierung mit dem Konstrukt aus Hefeprecursor und der Sequenz des maturierten Proteins der Rinderuntereinheit wiederholt und die Expression durch Northern Blot bestätigt. Western Blot Analysen von Hefemitochondrien und ganzen Hefezellen zeigten jedoch in keiner Fraktion die Untereinheit VIa der Rinderherz COX. Messungen der Aktivitäten von COX an solubisierten Mitochondrien ergaben keine Unterschiede zwischen Deletionsmutante und den Komplementierungsmutanten. Das Gen der Rinderuntereinheit VIa wurde in Hefe zwar exprimiert, jedoch das Protein nicht in Hefe COX assembliert, offenbar da 35% Homologie zwischen Rinder Untereinheit VIa und Hefeuntereinheit VIa dafür nicht ausreichen. An solubisierten Hefemitochondrien wurden kinetische Messungen polarographisch durchgeführt. An der Deletionsmutante der Untereinheit VIa wurde die Rolle dieser Untereinheit bei der Regulation von Hefe COX nachgewiesen. Fehlt diese Untereinheit, so sinkt die Aktivität des Enzyms um 50%. Gleichzeitig zeigen Eadie–Hofstee–Plots der Deletionsmutanten im Gegensatz zum Wildtypenzym eine einphasige Kinetik. Damit wurde die Beteiligung der Untereinheit VIa an der Bindung von Cytochrom c an COX nachgewiesen, und das von Ferguson–Miller 1976 postulierte „Zwei–Bindungsstellen–Modell“ bestätigt. Für fünf Aminosäuren der Hefeuntereinheit VIa wurde eine konkrete Beteiligung an der Cytochrom c Bindung postuliert. Messungen mit unspezifischem Pferde Cytochrom c ergaben eine um 70% reduzierte Aktivität des Hefeenzymen und eine 10–fache Verstärkung der allosterischen Hemmung durch ATP. Die von Arnold und Kadenbach (Eur. J. Biochem. 249 (1997) 350–354) beschriebene Kontrolle der Atmung durch allosterische Hemmung der COX durch ATP wurde in dieser Arbeit erstmals an einem niederen Eukaryoten gezeigt, und damit seine allgemeine Gültigkeit bei Eukaryoten bewiesen. Durch Deletion der Untereinheit VIa wurde die allosterische Hemmung der Cytochrom c Oxidase Aktivität durch ATP nicht beeinflusst.

---

...

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I., Nierlich, D.P., Rose, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A., Staden, R. and Young I. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–65.
- Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P., Vallone, B. and Brunori, M. (1988) ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* 256, 835–40.
- Arnold, S. and Kadenbach, B. (1997) Cell respiration is regulated by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 249, 350–54.
- Arnold, S. (1997) Die Struktur der Cytochrom c Oxidase verschiedener Vertebraten sowie deren Regulation durch Thyreoidhormone und den Energiespiegel der Zelle. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Arnold, S., Goglia, F. and Kadenbach, B. (1998) 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 252, 325–30.
- Bernardi, G. (1973) Chromatography of proteins on hydroxyapatite. *Methods Enzymol.* XXVII 471–479.
- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. and Slater, E.C. (1977) Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 955–1026.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. and Gotschlich, E.C. (1984) A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Antibody on Western Blots. *Anal. Biochem.* 136, 175–79.
- Blenkinsop, C., Aitken, A.E. and Wilson, M.T. (1996) Physical and functional characterization of monomeric and dimeric cytochrome c oxidases. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 421–28.
- Brooks, S.P.J. and Nicholls, P. (1982) Anion and ionic strength effects upon the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 33–43.
- Brown, W.M., Prager, E.M. and Wilson, A.C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18, 225–39.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villiani, G. and Papa, S. (1991) H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. *FEBS Lett.* 208, 179–82.
- Capaldi, R.A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 569
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–59.
- Coglievina, M., Klima, R., Bertani, L., Delneri, D., Zaccaria, P. and Bruschi, C.V. (1997) Sequencing of a 40.5 kb fragment located on the left arm of chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 55–64.
- Cooper, C.E. (1990) The steady-state kinetics of cytochrome c oxidation by cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1017, 187–203.
- De Vries, S. and Marres, C.A.M. (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 895, 205–39.
- De Blas, A.L. and Cherwinski, H.M. (1983). Detection of Antigens on Nitrocellulose Paper Immunoblots with Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.* 133, 214–219.
- Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. (1995) PCR Primer, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Ewart, G.D., Zhang, Y.-Z. and Capaldi, R.A. (1991) Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development. *FEBS Lett.* 292, 79–84.
- Exner, S. (1997) Isolierung und Charakterisierung der cDNAs für die Cytochrom c Oxidase Untereinheiten Va und VIa der Forelle und Evolution von Cytochrom c Oxidase Untereinheiten. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Fabrizi, G.M., Rizzuto, R., Nakase, H., Mita, S., Kadenbach, B. and Schon, E.A. (1989) Sequence of a cDNA specifying subunit VIa of human cytochrome c oxidase. *Nuc. Acid Res.* 17 (15), 6409.
- Fabrizi, G.M., Sadlock, J., Hirano, M., Mita, S., Koga, Y., Rizzuto, R., Zeviani, M. and Schon, E.A. (1992) Differential expression of genes specifying two isoforms of subunit VIa of human cytochrome

- c oxidase. *Gene* 119, 307–12.
- Ferguson–Miller, S., Brautigan, D.L. and Margoliash, E. (1976) Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 251, 1104–1115.
  - Ferguson–Miller, S., Brautigan, D.L. and Margoliash, E. (1978) Definition of cytochrome binding domains by chemical modification. *J. Biol. Chem.* 253, 149–59.
  - Follmann, K., Arnold, S., Ferguson–Miller, S. and Kadenbach, B. (1998) Cytochrome c Oxidase from Yeast but not from Procaryotes is Allosterically Inhibited by ATP. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, im Druck.
  - Frank, V. (1997) Regulation der Effizienz der Energietransduktion in der Cytochrom c Oxidase durch Nukleotidbindung an die Untereinheit VIa. Dissertation, Philipps–Universität Marburg
  - Frank, V. and Kadenbach, B. (1996) Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>–</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Lett.* 382, 121–24.
  - Frohman, M.A. Rapid Amplification of Complementary DNA Ends for Generation of Full– Length Complementary DNAs: Thermal RACE. *Meth. Enzymol.* 218, 340– 356.
  - Garber, E.A.E. and Margoliash, E. (1990) Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase: An understanding of the high– to low–affinity transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1015, 279–87.
  - Gasser, S.M., Daum, G. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13034–41.
  - Geier, B.M., Schägger, H., Ortwein, C., Link, T.A., Hagen, W.R., Brandt, U. and VonJagow, G. (1995) Kinetic properties and ligand binding of the eleven–subunit cytochrome–c– oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large–scale purification method. *Eur. J. Biochem.* 227, 296–302.
  - Glerum, D.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1995) Cloning and Characterization of COX14, Whose Product Is Required for Assembly of Yeast Cytochrome Oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 15585–90.
  - Glerum, D.M. and Tzagoloff, A. (1997) Submitochondrial distributions and stabilities of subunit 4,5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett.* 412, 410–14.
  - Hakvort, T.B.M., Moolenaar, K., Lankvelt, A.H.M., Sinjorgo, K.M.C., Dekker, H.L. and Muijsers, A.O. (1987) Separation, stability and kinetics of monomeric and dimeric bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 894, 347–54.
  - Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlmann, K., Freedman, L.P., Carlstedt–Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafson, J.–A. and Kaptein, R. (1990) Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA–binding domain. *Science* 249, 175–60.
  - Haltia, T., Saraste, M. and Wikström, M. (1982) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: A site–directed mutagenesis study. *EMBO J.* 10, 2015–21.
  - Heinisch, J.J. (1993) Expression of heterologous phosphofructokinase in yeast. *FEBS Lett.* 328, 35–40.
  - Hildebrandt, P., Vanhecke, F., Buse, G., Soulimane, T. and Mauk, A.G. (1993) Resonance Raman Study of the Interactions between Cytochrome c Variants and Cytochrome c Oxidase. *Biochem.* 32, 10912–22.
  - Hjerten, S. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 466–467.
  - Hüther, F.–J. and Kadenbach, (1986) Specific Effects of ATP on the Kinetics of Reconstituted Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *FEBS Lett.* 207, 89–94.
  - Hüttemann, M., Exner, S., Arnold, S., Lottspeich, F. and Kadenbach, B. (1997) The cDNA sequence of cytochrome c oxidase subunit VIa from carp and rainbow trout suggest the absence of isoforms in fish. *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 14–18.
  - Ito, H., Fukado, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of yeast cells with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.
  - Iwata, S., Ostermeier, Ch., Ludwig, B. and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376, 660–669.
  - Jacobs, E.E., Andrews, E.C., Cunningham, W. and Crane, F.,L. (1966) Membraneous Cytochrome Oxidase Preparation–Purification, Properties and Reaction Characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 87–94.
  - Jarausch, J. and Kadenbach, B. (1985a) Structure of the Rat Liver Cytochrome c Oxidase Complex. I. Studies on Nearest Neighbour Relationship of Polypeptides with Crosslinking Reagents. *Eur. J.*

Biochem. 146, 211–17.

- Jarausch, J. and Kadenbach, B. (1985b) Structure of the Rat Liver Cytochrome c Oxidase. II. Topological Orientation of Polypeptides in the Membrane as Studied by Proteolytic Digestion and Immunoblotting. *Eur. J. Biochem.* 146, 219–25.
- Jones, J., Prakash, L. (1990) Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Selectable Markers in pUC18 Polylinkers. *Yeast* 6: 363–366.
- Kadenbach, B. (1966) Der Einfluß von Thyroidhormonen in vivo auf die Oxidative Phosphorylierung und Enzymaktivität in Mitochondrien. *Biochem. Z.* 344, 49–75.
- Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R. and Merle, P. (1983) Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecylsulfate–gel electrophoresis procedure. *Anal. Biochem.* 129, 517–21.
- Kadenbach, B. and Stroh, A. (1984) Different reactivity of carboxylic groups of cytochrome c oxidase polypeptides from pig liver and heart. *FEBS Lett.* 173, 374–80.
- Kadenbach, B., Stroh, A., Ungibauer, M., Kuhn–Nentwig, L., Büge, U. and Jarausch, J. (1986) Isozymes of Cytochrome c Oxidase: Characterization and Isolation from Different Tissues. *Methods Enzymol.* 126, 32–45.
- Kadenbach, B., Kuhn–Nentwig, L. and Büge, U. (1987) Evolution of a regulatory enzyme: cytochrome c oxidase (Complex IV). *Curr. Top. Bioenerg.* 15, 113–61.
- Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F.–J., Reimann, A. and Steverding, D. (1991) Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 321–34.
- Kadenbach, B. and Reimann, A. (1992) Cytochrome c Oxidase: Tissue–Specific Expression of Isoforms and Regulation of Activity. In: *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*. Elsevier Science Publishers, 241– 63.
- Korshunov, S.S., Skulachev, P. and Starkov, A.A. (1997) *FEBS Lett.* 416, 15–18. Kyhse–Andersen, J. (1984) Electroblotting of Multiple Gels: A Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203–209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–85.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31–35.
- Maarse, A.C., Van Loon, A.P.G.M., Riezman, H., Gregor, I., Schatz, G. and Grivell, L.A. (1984) Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: Cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J.* Vol.3 no.12, 2831–37.
- Malmström, B.G. (1989) The Mechanism of Proton Translocation in Respiration and Photosynthesis. *FEBS Lett.* 250, 9–21.
- Margoliash, E., Barlow, G.H. and Byers, V. (1970) Different binding properties of cytochrome c: Possible relevance for mitochondrial ion transport. *Nature* 228, 723–26.
- Mell, O., Seibel, P. and Kadenbach, B. (1994) Structural organization of the rat genes encoding liver– and heart– type of cytochrome c oxidase subunit VIa and a pseudogene related to COXVIa–L cDNA. *Gene* 140, 179–86.
- Merle, P., Jarausch, J., Trapp, M., Scherka, R. and Kadenbach, B. (1981) Immunological and chemical characterization of rat liver isoform cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 669, 222–30.
- Merle, P. and Kadenbach, B. (1982) Kinetic and structural differences between cytochrome c oxidases from beef liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 125, 239–44.
- Mewes, H. W., Albermann, K., Bähr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer, F. and Zollner, A. (1997) Overview over the yeast genome. *Nature* 387 (6632 Suppl.), 7–65.
- Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *Biol. Rev.* 41, 445–502.
- Mulligan–Pullyblank, P., Spitzer, J.S., Gilden, B.M. and Fetrow, J.S. (1996) Loop Replacement and Random Mutagenesis of (–Loop D, Residues 70–84, in Iso–1–cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 271, 8633–45.
- Napiwotzki, J. (1997) Bindung von Adeninnukleotiden an die Cytochrom c Oxidase und deren Regulation der Enzymaktivität. Dissertation, Philipps–Universität Marburg

- Napiwotzki, J., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Kadenbach, B. (1997) ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity. *Biol. J.* 378, 1013–21.
- Napiwotzki, J. and Kadenbach, B. (1998) Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol. Chem.* 379, 335–39.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N. (1980) Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Anal. Biochem.* 105, 361–63.
- O'Shea, P.S., Petrone, G., Casey, R.P. and Azzi, A. (1984) The current–voltage relationship of liposomes and mitochondria. *Biochem. J.* 219, 719–26.
- Papa, S. (1976) Proton Translocation Reactions in the Respiratory Chains. *Biochim. Biophys. Acta* 456, 39–84.
- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. and Minuto, M. (1991) The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>−</sup> stoichiometry. *FEBS Lett.* 208, 183–86.
- Penttilä, T. (1983) Properties and reconstitution of a cytochrome oxidase deficient in subunit III. *Eur. J. Biochem.* 133, 355–61.
- Poyton R.O. and Groot, G.S.P. (1975) Biosynthesis of Polypeptides of Cytochrome c Oxidase by Isolated Mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 172–76.
- Poyton, R.O., Goehring, B., Droste, M., Sevarino, K., Allen, L. and Zhao, X.-J. (1995) Cytochrome-c Oxidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *M.E.* 260, 97–116.
- Prieto, S., Bouillaud, F. and Rial, E. (1995) The Mechanism of the ATP-Induced Uncoupling of Respiration in Mitochondria of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 307, 657–61.
- Rafferty, St. P., Guillemette, J.G., Berghuis, A.M., Smith, M., Brayer, G.D. and Mauk, A.G. (1996) Mechanistic and Structural Contributions of Critical Surface and Internal Residues to Cytochrome c Electron Transfer Reactivity. *Biochem.* 35, 10784–92.
- Reimann, A., Hüther, F.-J., Berden, J.A. and Kadenbach, B. (1988) Anions induce conformational changes and influence the activity and photoaffinity-labelling by 8-Azido-ATP of isolated cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* 254, 723–30.
- Reimann, A., Röhm, K.-H. and Kadenbach, B. (1993) Ferricytochrome c Induces Monophasic Kinetics of Ferrocycytochrome c Oxidation in Cytochrome c Oxidase. *J. Bioener. Biomembr.* 25, 393–99.
- Rieder, R. and Bosshard, H.R. (1980) Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc<sub>1</sub>, and cytochrome c<sub>1</sub>. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 255, 4732–39.
- Rieger, T., Napiwotzki, J., Hüther, F.-J. and Kadenbach, B. (1995) The number of nucleotide binding sites in cytochrome c oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 34–40.
- Rich, P.R. (1991) The Osmochemistry of Electron-Transfer Complexes. *Biosci. Rep.* 11, 539–568.
- Rigoulet, M., Guerin, B. and Denis, M. (1987) Modification of Flow-Force Relationships by external ATP in Yeast Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 168, 275–79.
- Robert, H. and Hess, B. (1977) Kinetics of Cytochrome c Oxidase from Yeast. Membrane-Facilitated Electrostatic Binding of Cytochrome c Showing a Specific Interaction with Cytochrome c Oxidase and Inhibition by ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 462, 215–34.
- Rothstein, (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101, 202–11.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463
- Sambrook, Fritsch and Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Vol.2, 9.31
- Saraste, M. (1990) Structural features of cytochrome c oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* 23, 331–66.
- Scarpulla, R.C. and Nye, S.H. (1986) Functional expression of rat cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6352–56.
- Schagger, H. and Von Jagow, G. (1991) Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
- Schagger, H. and Von Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schiavo, G. and Bisson, R. (1989) Oxygen influences the subunit structure of cytochrome c oxidase in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 264, 7129–34.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A. and Trumpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nuc. Ac. Res.* 18, No.10, 3091–3092.

- Schneyder, B. (1990) Herstellung, Charakterisierung und Anwendung monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheiten der Cytochrome c Oxidase. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1–28.
- Smith, E. O., BeMent, D.M., Grossman, L.I. and Lomax, M.I. (1991) The cDNA for the heart/muscle isoform of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa encodes a presequence. *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 266–68.
- Solioz, M., Carafoli, E. and Ludwig, B. (1982) The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 257, 1579–82.
- Southern, E.M. (1975) Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503–517.
- Stearns, S., Ma, H. and Botstein, D. (1990) Manipulating Yeast Genome Using Plasmid Vectors. *Methods Enzymol.* 185, 280–440.
- Steenaart, N. and Shore, G.C. (1997) Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett.* 415, 294–98.
- Suarez, M.D., Revzin, A., Narlock, R., Kempner, E.S., Thompson, D.A. and Ferguson-Miller, S. (1984) The functional and physical form of mammalian cytochrome c oxidase determined by gel filtration, radiation inactivation, and sedimentation equilibrium analysis. *J. Biol. Chem.* 259, 13791–99.
- Suissa, M. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13048–55.
- Taanman, J.-W. and Capaldi, R.A. (1994) Regulation of Cytochrome c Oxidase by Interaction of ATP at Two Binding Sites, One on Subunit VIa. *Biochem.* 33, 11833–41.
- Taanman, J.-W. and Capaldi, R.A. (1993) Subunit VIa of Yeast cytochrome c Oxidase Is Not Necessary for Assembly of the Complex but Modulates the Enzyme Activity. *J. Biol. Chem.* 268, 18754–61.
- Taanman, J.-W., Herzberg, N.H., de Vries, H., Bolhuis, P.A. and Van den Borgert, C. (1992) Steady-state transcript levels of cytochrome c oxidase genes during human myogenesis indicate subunit switching of subunit VIa and co-expression of subunit VIIa isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 155–162.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269, 1069–74.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-Subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–44.
- Tzagoloff, A., Nobrega, M., Gorman, N. and Sinclair, P. (1993) On the function of the yeast COX10 and COX11 gene products. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31, 593–98.
- Villalba, J.M., Palgren, M.G., Berberian, G.E., Ferguson, C. and Serrano, R. (1992) Functional Expression of Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Yeast Endoplasmic Reticulum. *J. of Biol. Chem.* 267, No.17, 12341–12349.
- Von Jagow, G. and Klingenberg, M. (1972) Close correlation between antimycin titer and cytochrome bc<sub>1</sub> content in mitochondria of chloramphenicol treated *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 24, 278–282.
- Von Jagow, G. und Engel, W.D. (1980) Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems in Mitochondrien. *Angew. Chem.* 92, 684–700.
- Wallace, D.C. (1982) Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46, 208–40.
- Wallace, D.C., Ye, J., Neckelmann, S.N., Singh, G., Webster, K.A. and Greenberg, B.D. (1987) *Curr. Genet.* 12, 81–90.
- Wan, B., Doumen, C., Duszynski, J., Salama, G., Vary, T.C. and LaNoue, K.F. (1993) Effects of cardiac work on electrical potential gradient across mitochondrial membranes in perfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* 265, (Heart Circ. Physiol. 34), H453–H460.
- Wan, B. and Moreadith, R.W. (1995) Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform cytochrome c oxidase VIa. *J. Biol. Chem.* 270, 26433–40.
- Waterland, R.A., Basu, A., Chance, B. and Poyton, R.O. (1991) The isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V alter the in vivo kinetic properties of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 4180–86.

- Weishaupt, A. and Kadenbach, B. (1992) Selective removal of Subunit VIb Increases the Activity of Cytochrome c Oxidase. *Biochem.* 31, 11477–81. Wikström, M., Krab, K. and Saraste, M. (1981) *Cytochrome Oxidase: A Synthesis*. Academic Press, New York, USA.
  - Wikström, M. and Saraste, M. (1984) *Bioenergetics* (Ernester, L., Eds.), Elsevier, Amsterdam, 49–94.
  - Witt, H., Zickermann, V. and Ludwig, B. (1995) Site-directed mutagenesis of cytochrome c oxidase reveals two acidic residues involved in the binding of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1230, 74–76.
  - Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. and Ludwig, B. (1998) Tryptophan 121 of Subunit II is the Electron Entry Site to Cytochrome c Oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* 273, 5132–36.
- 

-

# Anhang

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Amp <sup>r</sup>	Ampillicin ( Resistenz)
As	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BH	Rinderherz (bovine heart)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
COX	Cytochrom c Oxidase
Cyt c	Cytochrom c
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Extinktion
(	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E.coli	Escherichia coli
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
His	Histidin
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-( $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobasen
KM	Michaelis-Konstante
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
min	Minuten
MES	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Gepufferte NaCl-Lsg. (phosphate buffered saline)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat



Pk	Pyruvatkinase
Pi	anorganisches Phosphat
Prec.	Precursor
RNA	Ribonukleinsäure
S	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSC	
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminale Deoxynukleotidyl Transferase
TEMED	N, N, N', N'–Tetramethylethylendiamin
TNP–ATP	2'(3')–O–(2,4,6–Trinitrophenyl)–Adenosintriphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TE–Puffer	Tris–EDTA–Puffer
TN	Turnover
V	Volt
vMax	maximale Geschwindigkeit
X–Gal	5–Bromo–4–chloro–3–indoyl–(–galactopyranosid
y	Hefe (yeast)

## DNA–Sequenz der Untereinheit VIa aus Rinderherz

SWISS–PROT: P07471; COX\_BOVIN. EMBL: BTCOX6AH Lit.: Smith et al., 1991

```

1      CCCAGCTTCT GCCATACATG GCTTTGCCTC TGAAGTCCTT GAGTCGGGGC
51     TTGGCCAGTG CGGCCAAGGG AGACCATGGT GGGACAGGAG CCCGCACCTG
101    GCGCTTCCTG ACTTTCGGGC TGGCGCTCCC GAGCGTGGCC CTCTGCACCC
151    TCAACTCCTG GCTCCACTCG GGCCACCGCG AGCGCCCGGC ATTCATCCCT
201    TACCATCACC TCCGGATCCG CACCAAGCCC TTCTCATGGG GAGACGGCAA
251    CCACACTTTT TTCCACAATC CCCGGGTCAA CCCTCTGCCC ACGGGCTACG
301    AAAAGCCTTG AGGCTTGGCT GATGCCCCCC AGACACAATA AAAT

```

### Wichtigste Schnittstellen:

Name	Anzahl	Position
Alu I	1	4
BamH I	1	214
Bgl I	1	54
EcoR II	2	97, 157
Fok I	1	194
Nco I	1	74
Sma I	1	271
Xho II	1	214
Xma I	1	271

### Aminosäuresequenz:

```

1      malplkslsr glASAAKGDH GGTGARTWRF LTFGLALPSV ALCTLNSWLH
51     SGHRERPAFI PYHHLRIRTK PFSWGDGNHT FFHNPRVNPL PTGYEKP 97

```

DNA–Sequenz der Untereinheit VIa aus Rinderleber EMBL: BTCCOSU4 Lit.: Ewart et al., 1991

```

1      TCGAGTGGCG CCCACGGAGA AGAGGGCTCG GCTCGCATGT GGAAGGCCCT
51     CACCTTATTC GTGGCGCTCC CTGGGGTGGG AGTGAGCATG CTGAATGTCT

```

```

101      TCATGAAGTC GCACCACGGA GAGGAGGAGA GACCCGAGTT AGTGGCCTAT
151      CCCCATCTCC GCATCAGGTC CAAGCCCTTT CCCTGGGGAG ATGGTAACCA
201      TACCCTATTC CATAACCCCT ATGTGAACCC GCTTCCAACC GGCTATGAAG
251      ATGAGTAA

```

### Wichtigste Schnittstellen:

Name	Anzahl	Position
Alu I	1	30
Ava I	1	133
EcoR II	2	70, 182
Mae III	1	194
Mbo II	3	19, 98, 247
Xmn I	1	93

### Aminosäuresequenz:

```

1      SSGAHGEEGS ARMWKALTIF VALPGVGVSM LNVFMKSHHG EEERPEFVAY
51     PHLRIRSKPF PWGDGNHTLF HNPVHNPLPT GYEDE 85

```

## DNA-Sequenz der Untereinheit Vla aus *S. cerevisiae*

SWISS PROT: P32799 EMBL: SCCOX13 Lit.: Taanman and Capaldi, 1993

```

1      ctgcagcgggaagtaaattggtttcctggtctgtattagacaaaactttgga
51     atagagaaggatatggtttatgtccaataattattatccgagtcggtgta
101    tttttttacatcaactggaacaatttattaccgggatgtttaaaaattgt
151    tgtcgcctggagaaagctaatactagttctggccatattttcaaccatta
201    aacactactaatgtaattacttgacttatttgcctccactcttggtcgggt
251    tctttcccatggcgcatctaccattcttttttctactccaatcggtct
301    tactggaaactgtgggaatagcgaagaacgactattatttgctaatacag
351    agtaagctatcctgctgaataggtagacgatagtagtaaccaaacgcgcg
401    tatcctttcgattataccgctatgaatgtagtgatgggtgcggtattga
451    cacaatatagtaatttcgggtaatttttttcccaaccaatgagaggcgggt
501    actgggagtatcggtctaagagaatcgaaaaataacccccagctgggatg
551    tgatcacgatgagtgacgggatacattaaatataacaaacatacacgttg
600    ccttgaacgttttcactacacatcgcatgtgtttatctagatttaaaat
651    catattactacagttctacagttatacaaaataacaaacaatagaaaaATG
701    TTTGGACAGTGTGCTAAGAGATATGCATCTTCATTACCCCCAAATGCTTT
751    GAAACCTGCATTTGGCCCACCAGATAAAGTGGCAGCTCAAAAATTTAAAG
801    AATCATTAATGGCCACTGAAAAGCATGCGAAGGACACATCTAATATGTGG
851    GTTAAAATCTCAGTTTGGGTGCGCCTACCAGCAATTGCTTTAACAGCTGT
901    GAACACATACTTTGTTGAAAAGGAGCATGCTGAGCATCGTGAACATTTGA
951    AACATGTGCCAGACTCCGAATGGCCAAGGGATTACGAGTTTATGAATATC
1001   AGGTCTAAGCCTTTTTTCTGGGGTGACGGTGATAAGACATTATTCTGGAA
1051   TCCTGTTGTCAACAGGCACATCGAGCACGACGATTAAttaattgattaag
1101   tgagaataaacttttcgaaaaatttttatttatgataattttactaattc
1151   ttacttatttcttttatatttcgataaaaaaaaaattcaaaaataaaaaagat
1201   taatcctttgataggaactaaagggtactaggtattttggcgcggaagca
1251   tcattccgttcttaaacatctatatataataattatattgcaaatgtat
1301   aagcatttaaaaacataaacatgcacctatgaagaagaatttaagacggtt
1351   ttatttttatgttccacgcgttttggtgaagtgatgaaagaagtctgat
1401   aaagggtatgctcggttaataattgatacagtggttataagatagctaatac
1451   agaaaaaaaaacgaaagaaaatggtataagtctcagaataatgataataaa
1501   acacgcttgaagtagaataaaaaataaagttagagaagataaaaaaaaaa
1551   ataaagatagaagattttcaatgaggggcaaactctaaatctaaaaaatt
1601   tgaattcaagttcaatttaatttcaattaaaacagtagtagtatgtggg
1651   gaagatatgggataaaaaaaagtaagggaaaaataaggaattattataatt
1701   ataatgcggaaaaaaatgaataaattattagttgctgcaacagcaatacta
1751   ttttctcttggtatgccatgagaaatgtaaaatattcttcttgaaatcaat
1801   atcgtcaccaccaatccttatttcttgagacaccttgcgctagcgaaccgt
1851   atcctttgttctctgaacgctgttttgcagcttgtaaacacgatttcttc
1901   atttcggttcccgagtcctccgaatttgctccttctcctcccgctatact
1951   gcttctaga

```

Der ORF des Gens ist in Großbuchstaben angegeben, die flankierenden Regionen in Kleinbuchstaben.

### Für die Klonierung wichtige Schnittstellen, nach Position sortiert:

Name	Anzahl	Position
Pst I	1	1
Spe I	1	172
Nco I	1	257
Bcl I	1	551
Xmn I	1	605
Xba I	2	637, 1954
Hind II	1	1058
Asu II	1	1114
EcoR I	1	1602
Ssp I	1	1780
Pvu II	2	540, 894

### Aminosäuresequenz:

```

1      mfrqcakryA SSLPPNALKP AFGPPDKVAA QKFKESLMAT EKHAKDTSNM
51     WVKISVWVAL PAIALTAVNT YFVEKEHAEH REHLKHVPDS EWPRDYEFMN
101    IRSKPFFWGD GDKTLFWNPV VNRHIEHDD 129

```

### Aminosäure Sequenz Pferde–Cytochrom c

```

1      GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGKGKHTGP NLHGLFGRKT GQAPGFTYTD
51     ANKNKGITWK EETLMEYLEN PKKYIPGTMK IFAGIKKKTE REDLIAYLKK
101    ATNE 104

```

### Aminosäure Sequenz Hefe Iso–1 Cytochrom c

```

1      TEFKAGSAKK GATLFKTRCL QCHTVEKGGP HKVGPNLHGI FGRHSGQAEG
51     YSYTDANIKK NVLWDENNMS EYLTNPKKYI PGTKMAFGGL KKEKDRNDLI
101    TYLKKACE 108

```

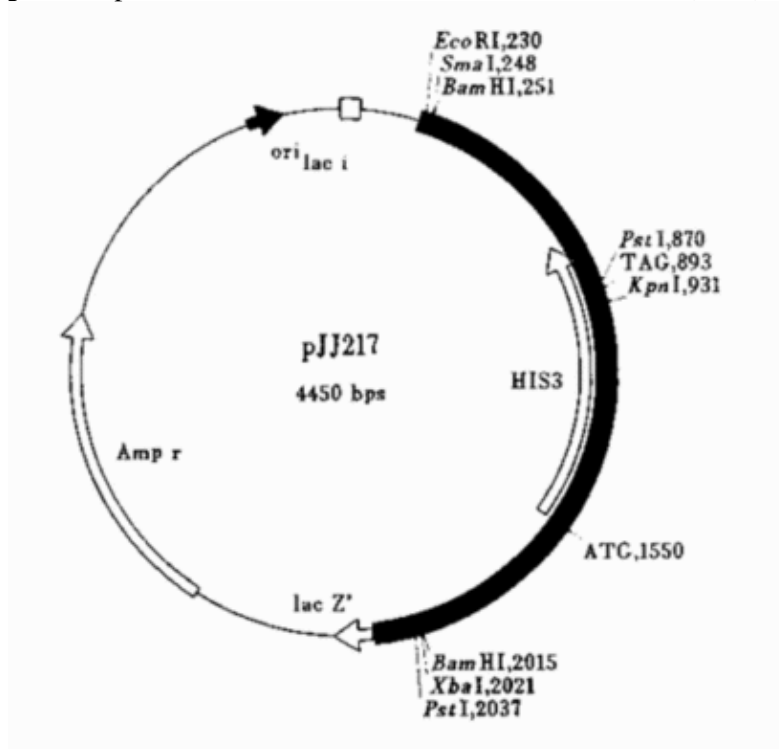
## Genotypen der verwendeten und erzeugten Hefestämme:

Neu eingeführte Gene und Veränderungen sind unterstrichen.

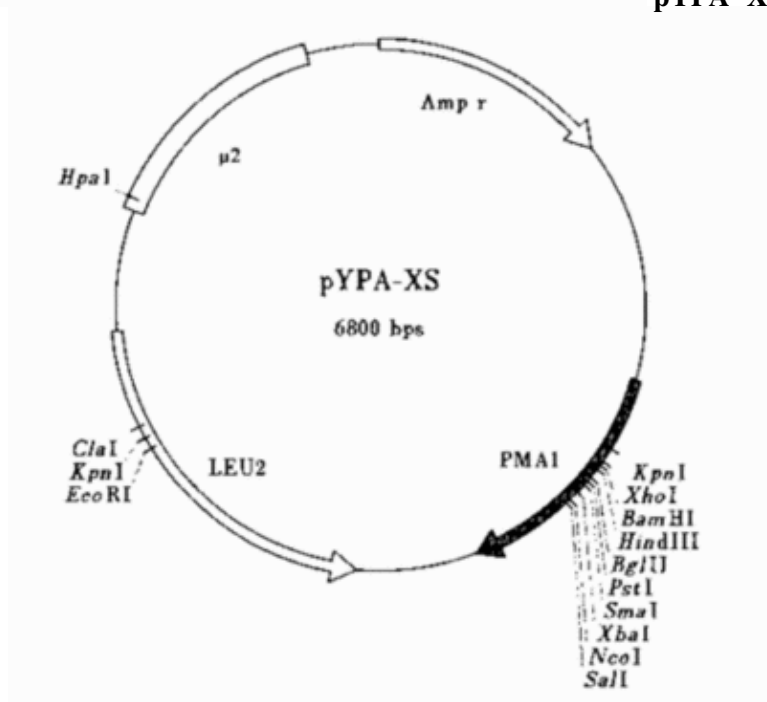
YPH499	d YPH500 Isogener diploider Stamm <u>ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta1 d ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta</u>
SFY526	Isogener diploider Stamm MATa, <u>ura3–52</u> , <u>his3–200</u> , <u>ade2–101</u> , <u>lys2–801</u> , <u>trp1– 901</u> , <u>leu2–3</u> , <u>112</u> , <u>canr</u> , <u>gal4–542</u> , <u>gal80–538</u> , <u>URA3::GAL1–lacZ</u>
(VIa	haploider Stamm <u>ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1– delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta1 d ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta</u> , <u>dcox13::HIS3</u>
dVIa –BHVIA	haploider Stamm <u>ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1– delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta1 d ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta</u> , <u>dcox13::HIS3</u> , <u>BHVIA</u>
dVIa –yPrec–BHVIA	haploider Stamm <u>ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta1 d ura3–52</u> , <u>lys2–801</u> (amber), <u>ade2–101</u> (ochre), <u>trp1–delta 63</u> , <u>his3–delta 200</u> , <u>leu2–delta</u> , <u>dcox13::HIS3</u> , <u>yPrec–BHVIA</u>

## Karten der verwendeten und erzeugten Plasmide:

**pJJ217:** pJJ217 in E.coli. B-263 Lit.: Yeast, 6: 363–366 (1990)



**pYPA-XS:** Shuttle Vektor, in E.coli



JM105 Lit.:

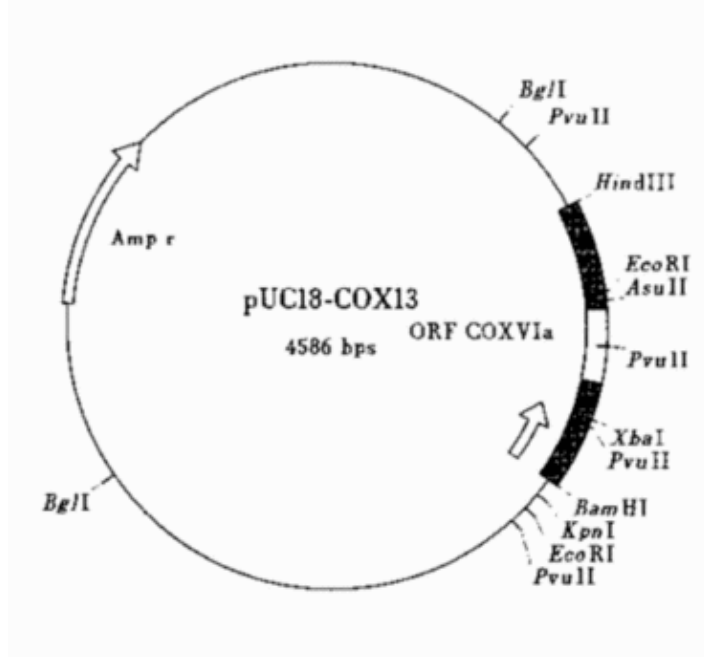
Sequenz der "multiple cloning site": S = Sal I, N = Nco I, Xb = Xba I, Sm = Sma I, P = Pst I, Bg = Bgl II, H = Hind III, B = BamH I, X = Xho I

5'-TCTCTTTTAT ACACACATTC AAAAGAAAGA AAAAAAATAT ACCCCAGCCT

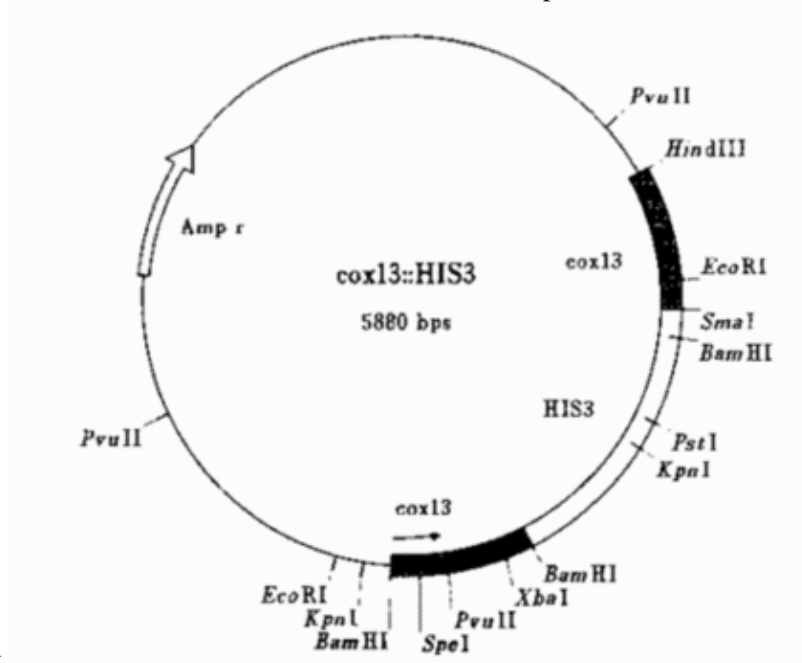
S N Xb Sm P Bg H B X  
CGACGTCGAC CATGGTCTAG ACCCGGGCTG CAGATCTAAG CTTGGATCCC

TCGAGGGAA-3'

**pUC18-COX13** pUC18-COX13 in E.coli XL1-Blue Lit.: diese Arbeit



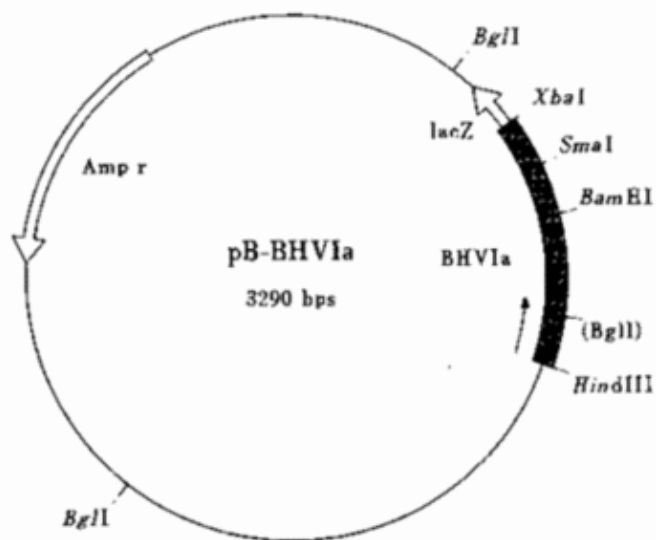
**cox13::HIS3** pUC18-cox13::HIS3 in E.coli



XL1-Blue Lit.: diese Arbeit

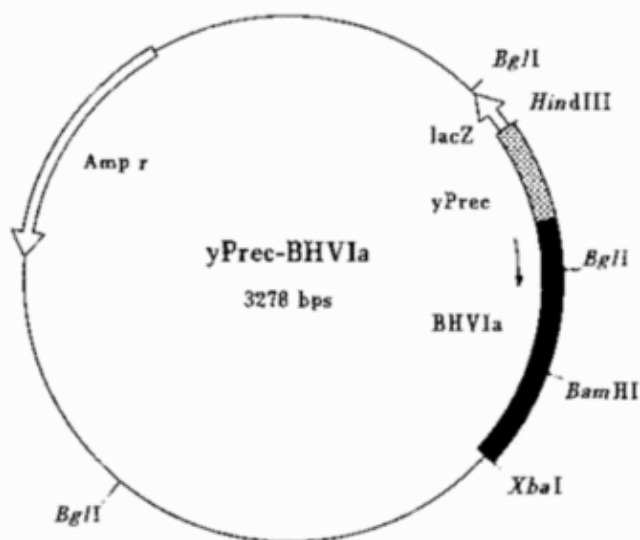
pBluescript KS--BHVIa in E.coli XL1-Blue Lit.: diese Arbeit

**pB-BHVIa**

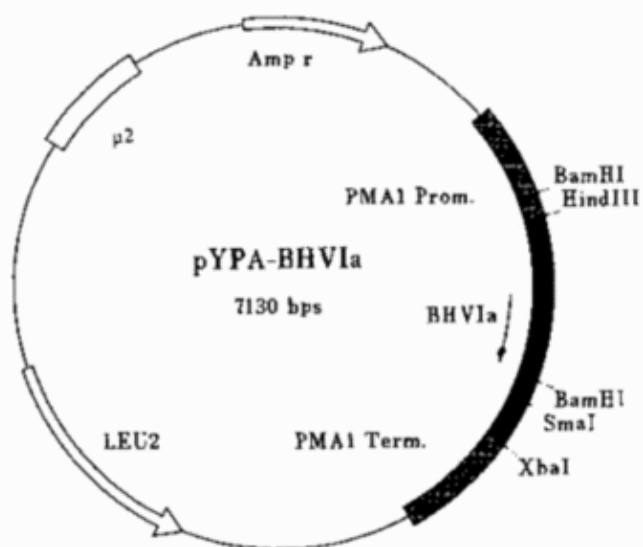


yPrec-BHV1a pBluescript

SK---yPrec-BHV1a in E.coli XL1-Blue Lit.: diese Arbeit



pYPA-BHV1a pYPA-XS-BHV1a in E.coli



XL1-Blue Lit.: diese Arbeit

pYPA-XS-yPrec-BHV1a in E.coli XL1-Blue Lit.: diese Arbeit

pY-yPrecBHV1a

